

Beiträge zur Inhibierung der Proproteinkonvertase Furin

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Teodora Petrova Ivanova

aus Botevgrad, Bulgarien

Marburg/Lahn 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe und unter Betreuung von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie, Philipps-Universität Marburg, im Zeitraum von November 2014 bis Juni 2017 durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Schlitzer

Eingereicht am 23.10.2017

Tag der mündlichen Prüfung am 13.12.2017

Hochschulkennziffer: 1180

„Ignoramus et ignorabimus“

Emil Heinrich du Bois-Reymond

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	i
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielmoleküle zur Entwicklung neuer Wirkstoffe.....	1
1.2 Die Familie der Proproteinkonvertasen.....	2
1.3 Furin	6
1.3.1 Struktur, Aktivierung und intrazellulärer Transport.....	7
1.3.2 Physiologische und pathologische Funktionen.....	8
1.3.3 Bekannte Furininhibitoren und Anwendungsgebiete	13
1.3.4 Kristallstrukturen des Furin im Komplex mit niedermolekularen Inhibitoren....	21
2 Motivation und Zielsetzung der Arbeit.....	30
3 Ergebnisse und Diskussion	31
3.1 Synthese der Substrate und Inhibitoren.....	31
3.1.1 AMC-Substrate.....	32
3.1.2 Zyklische Inhibitoren und deren Referenzverbindungen.....	34
3.1.3 C-terminal verlängerte Peptidderivate.....	38
3.1.4 Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette	39
3.1.5 Derivate mit <i>N</i> -terminaler α -Guanidinogruppe	41
3.1.6 C-terminal verkürzte Peptidderivate.....	42
3.1.7 Modifizierung der P1-Position	43
3.1.8 Derivate mit Lysin in P2-Position	56
3.2 Enzymkinetik	58
3.2.1 Charakterisierung der AMC-Substrate	58
3.2.2 Charakterisierung der Furininhibitoren	62
3.2.3 Selektivitätsuntersuchungen mit PC1/3 und PC2.....	98
3.3 HPLC-Stabilitätsprüfungen.....	101

3.4	Zellkulturversuche.....	107
3.4.1	Influenzaviren.....	107
3.4.2	Alphaviren.....	111
3.4.3	Flaviviren.....	113
3.4.4	Diphtherietoxin.....	119
3.5	Toxizitätsstudien.....	122
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	127
4.1	Synthese und Enzymkinetik.....	127
4.1.1	Substrate.....	127
4.1.2	Inhibitoren.....	128
4.2	HPLC-Stabilitätsprüfungen.....	130
4.3	Zellkulturversuche.....	130
4.4	Toxizitätsstudien.....	131
5	Experimenteller Teil.....	132
5.1	Material und Methoden.....	132
5.1.1	Verwendete Materialien.....	132
5.1.2	HPLC.....	132
5.1.3	Dünnschichtchromatographie.....	134
5.1.4	Lyophilisierung.....	134
5.1.5	Massenspektrometrie.....	134
5.1.6	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	134
5.1.7	Peptidsynthese.....	135
5.2	Synthese der Substrate und Inhibitoren.....	135
5.2.1	Allgemeine Vorschriften.....	135
5.2.2	Niedermolekulare Vorstufen.....	144
5.2.3	Probesynthesen.....	161
5.2.4	AMC-Substrate.....	164
5.2.5	Zyklische Inhibitoren und deren Referenzverbindungen.....	165

5.2.6	C-terminal verlängerte Peptidderivate.....	168
5.2.7	Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette.....	171
5.2.8	Derivate mit N-terminaler α -Guanidinogruppe	172
5.2.9	C-terminal verkürzte Peptidderivate.....	173
5.2.10	Modifizierung der P1-Position	174
5.2.11	Derivate mit Lysin in P2-Position	185
5.2.12	Umwandlung der TFA-Salze in Hydrochloride	187
5.3	Enzymkinetische Messungen	190
5.3.1	Enzymkinetische Messungen mit der Propeptidase Furin	190
5.3.2	Enzymkinetische Messungen mit den Propeptidasen PC1/3 und PC2	196
6	Literaturverzeichnis	198
7	Anhang.....	I
7.1	Verbindungen.....	I
7.2	Verwendete Messparameter des Tecan Safire 2.....	VI
7.3	NMR-Spektren	VII
	Eidesstattliche Erklärung.....	LVII
	Lebenslauf	LVIII
	Danksagung	LIX

Abkürzungsverzeichnis

Für die Bezeichnung der proteinogenen Aminosäuren und ihrer Derivate wird der von IUPAC/IUBMB empfohlene Drei- und Einbuchstaben-Code verwendet. Sofern nicht anders angegeben, sind alle Derivate L-konfiguriert. D-Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet.

2-Nal	2-Naphthylalanin
4-Amba	4-Amidinobenzylamin
4-Amba(OH)	4-Hydroxyamidinobenzylamin
5-Ava	5-Aminovaleriansäure bzw. 5-Aminopentansäure
6-Cl-HOBt	6-Chlor-1 <i>H</i> -1,2,3-benzotriazol-1-ol
α_1 -PDX	α_1 -Antitrypsin Portland
Å	Angström
A	Ampere
Ac	Acetyl
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i> , Adrenocorticotropin
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMe	Aminomethyl
Ar	aromatisch
AS	Aminosäure
AU	<i>absorption unit</i> , Absorptionseinheit
β -NGF	<i>β-nerve growth factor</i>
ber.	berechnet
BHK-21	<i>baby hamster kidney-21</i> (Zelllinie)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
c, cyclo	Bezeichnung einer intramolekularen Zyklisierungsstelle
ca.	circa
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CHIKV	Chikungunya-Virus
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> (Zelllinie)
CMK	Chlormethylketon
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , zellpenetrierendes Peptid
°C	Grad Celsius

δ	chemische Verschiebung
d	Tag
D6R	Hexa-D-Argininamid
D9R	Nona-D-Argininmid
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl
DEA	Diethylamin
DEE	Diethylether
DENV	Dengue-Virus
EF	<i>edema factor</i> , Ödemfaktor
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherie-Toxin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electrospray</i> -Ionisation
EtOH	Ethanol
eq	Äquivalent
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FPV	<i>fowl plaque virus</i> , Geflügelpest
g	Gramm
gef.	gefunden
GHRH	<i>growth hormone-releasing hormone</i> , Somatoliberin
GLP	<i>glucagon-like peptide</i>
GMe	Guanidinomethyl
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HA, H	Hämagglutinin
HBTU	2-(1 <i>H</i> -1,2,3-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoridophosphat
HEK293	<i>human embryonic kidney</i> 293 (Zelllinie)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethansulfonsäure

(h)ERG	<i>(human) ether-à-go-go-related gene</i>
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HOBt	1 <i>H</i> -1,2,3-Benzotriazol-1-ol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Huh7	humane Leberzelllinie
Hz	Hertz
IαIp	Inter-α-Inhibitorprotein
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgE	Immunglobulin E
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>insulin-like growth factor</i> -Rezeptor
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
K	Kelvin
<i>K_a</i>	Assoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
<i>k_{cat}</i>	katalytische Konstante, Wechselzahl
<i>K_i</i>	Hemmkonstante; Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
<i>K_i^{app}</i>	apparente (scheinbare) Hemmkonstante
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante
<i>k_{obs}</i>	apparente (scheinbare) Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung
konz.	konzentriert
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (<i>excitation</i>)
L	Liter
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LF	Letalfaktor
<i>m-</i>	<i>meta-</i>
m	Meter
M	mol/L
M	molare Masse

MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MDCK II	<i>Madin-Darby canine kidney</i> II (Zelllinie)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MMP-2	Matrix-Metalloprotease-2
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MT1-MMP	<i>membrane type I-matrix metalloproteinase</i>
MTD	maximal tolerierbare Dosis
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NA, N	Neuraminidase
n.b.	nicht bestimmt
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
Nr.	Nummer
<i>o</i> -	<i>ortho</i> -
Orn	Ornithin
OSu	Succinimidester
<i>p</i> -	<i>para</i> -
PACE4	<i>paired basic amino acid-cleaving enzyme 4</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PC	Proteinkonvertase
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PEA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Exotoxin A
PFU	<i>plaque-forming units</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Aktivität der Wasserstoffionen
Phac	Phenylacetyl
pK_a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PL	Phospholipase
ppm	<i>parts per million</i>
PA	protektives Antigen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyAOP	7-Aza-1 <i>H</i> -1,2,3-benzotriazol-1-yl-oxotripyrrolidinophosphoniumhexafluoridophosphat

PyBOP	1 <i>H</i> -1,2,3-Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluoridophosphat
<i>quart</i>	quartär (Kohlenstoff)
R	Rest
R_f	Retentionsfaktor bei der Dünnschichtchromatographie
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> , relative Fluoreszenzeinheit
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rOrn	<i>reversed</i> Ornithin: über die Seitenkette in das Peptidrückgrat eingebaut
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Seite
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFTI	<i>sunflower trypsin</i> -Inhibitor
SKI-1	Subtilisin/Kexin Isozym-1
SFV	Semliki-Forest-Virus
ST	Shiga-Toxin
Suc	Succinyl
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Tle	<i>tert</i> -Leucin
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
UV	ultraviolett
v/v	Volumenanteil oder Volumenkonzentration
v	Geschwindigkeit
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
WNV	West-Nil-Virus
w/v	Massenkonzentration
ZIKV	Zika-Virus

1 Einleitung

1.1 Zielmoleküle zur Entwicklung neuer Wirkstoffe

Die moderne Wirkstoffforschung nutzt umfangreiche biochemische, molekularbiologische und bioinformatische Arbeitsmethoden. Dies erlaubt die Aufklärung genetischer Grundlagen multifaktorieller Erkrankungen und die Festlegung neuer Angriffspunkte für neuartige Therapien. Dank der Genomforschung lassen sich heutzutage viele Krankheitsprozesse auf molekularer Ebene erklären und nach Identifizierung des entsprechenden krankheitsassoziierten Zielmoleküls durch geeignete Wirkstoffe beeinflussen (Drews, 2000).

Vier biologische Makromolekültypen können prinzipiell durch niedermolekulare Therapeutika adressiert werden: Proteine, Polysaccharide, Lipide und Nukleinsäuren. Jedoch wirken die meisten zugelassenen Arzneistoffe über ihre Bindung an Proteine (Hopkins and Groom, 2002).

Am Anfang dieses Jahrtausends wurde die Zahl der krankheitsrelevanten Zielmoleküle (Targets), die durch bestehende Wirkstoffe tatsächlich adressiert werden, auf knapp 500 geschätzt. Etwa 30 % davon sind Enzyme, weitere 45 % Zellrezeptoren (Drews, 2000) (**Abbildung 1A**). Neuere Recherchen kommen zu einer Gesamtzahl von 324 Targets, die durch zugelassene Wirkstoffe mit bekanntem Wirkmechanismus adressiert werden, wobei über 80 % davon im menschlichen Genom kodierte Proteine sind. Die restlichen knapp 20 % verteilen sich auf unterschiedliche Zielstrukturen von Bakterien, Viren, Pilzen oder anderen pathogenen Organismen (Overington et al., 2006).

Das internationale Humangenomprojekt ergab, dass das menschliche Erbgut etwa 20 000 – 25 000 Protein-kodierende Gene enthält (International Human Genome Sequencing, 2004). Dabei eignen sich nur diese Proteine als potenzielle Zielmoleküle zur Wirkstoffentwicklung, die mit niedermolekularen chemischen Substanzen interagieren können und gleichzeitig mit pathologischen Prozessen assoziiert sind (Hopkins and Groom, 2002). Fast die Hälfte der zur Zeit zugelassenen niedermolekularen Arzneistoffe nutzt Enzyme menschlichen Ursprungs als Angriffspunkt, weitere gut 30 % adressieren Zellrezeptoren, wobei die meisten aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stammen (**Abbildung 1B**).

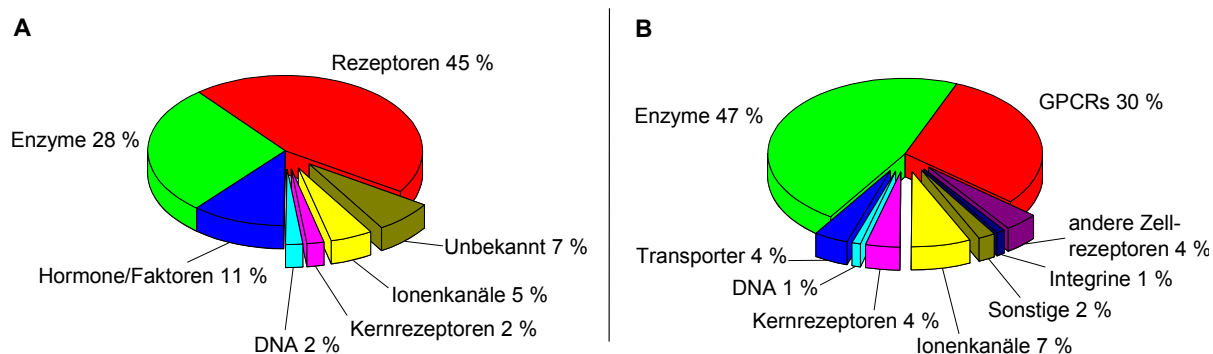


Abbildung 1: Verteilung der Zielmoleküle, die zur Zeit als therapeutische Angriffspunkte genutzt werden (A) (Drews, 2000) und Verteilung der medikamentösen Therapieansätze auf die jeweiligen Zielmoleküle (B) (Hopkins and Groom, 2002).

1.2 Die Familie der Propeptidkonvertasen

Aus den statistischen Daten wird ersichtlich, dass Enzyme vielversprechende Angriffspunkte für bereits etablierte, aber auch für zukünftige Therapien sind. Enzyme sind in der Regel proteinartige Makromoleküle, die eine biochemische Umsetzung entsprechender Substrate zu den jeweiligen Produkten unter physiologischen Bedingungen katalysieren. Je nach Reaktionstyp werden die Enzyme in sechs Klassen unterteilt (Klebe, 2009) (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Klassifizierung der Enzyme entsprechend der katalysierten Reaktionen (Klebe, 2009).

Bezeichnung der Enzymklasse	Beispiele
Oxidoreduktasen	Dehydrogenasen, Oxidasen, Oxygenasen, Hydroxylasen
Transferasen	Aminotransferasen, Phosphotransferasen
Hydrolasen	Esterasen, Lipasen, Phosphatasen, Proteasen
Lyasen	Decarboxylasen, Aldolasen, Synthasen
Isomerasen	Racemasen, Mutasen
Ligasen	Synthetasen, Carboxylasen

Zu den Hydrolasen zählen u.a. die Proteasen. Die menschlichen Proteasen kann man entsprechend ihres Katalysemechanismus in fünf Gruppen einteilen: die Metallo-, Serin-, Cystein-, Threonin- und Aspartylproteasen. (Oda, 2012; Rawlings et al., 2016; Rawlings et al., 2014). Je nach Sequenzhomologie oder Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen erfolgt die weitere Unterteilung der fünf Gruppen in Clans, Familien und Unterfamilien.

Die Mehrheit der katalytischen Domänen der Serinproteasen besitzt ein chymotrypsin- oder subtilisinartiges Faltungsmuster (Madala et al., 2010). Die Propeptidkonvertasen (PCs) gehören zu den subtilisinartigen Serinproteasen der Familie S8 im Clan SB der Serinproteasen. (**Abbildung 2**).

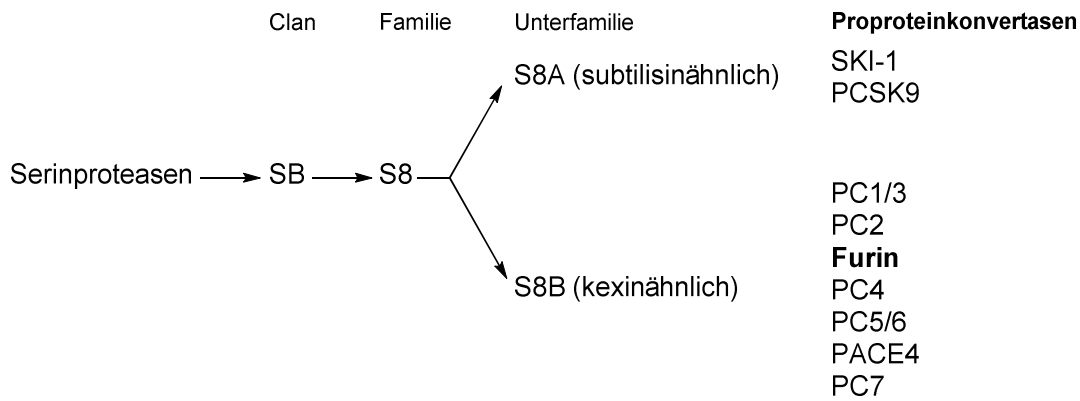


Abbildung 2: Hierarchische Einteilung der Proproteinkonvertasen innerhalb der Serinproteasen.

Derzeit gibt es neun bekannte PCs (Seidah and Prat, 2012). Dabei sind die beiden Vertreter SKI-1 und PCSK9 dem bakteriellen Subtilisin Carlsberg ähnlich und zählen zur Unterfamilie S8A. Die restlichen sieben furinartigen PCs ähneln der Protease Kexin aus dem Pilz *Saccharomyces cerevisiae*. Zu diesen kexinartigen PCs gehören neben Furin noch PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PACE4 und PC7; sie werden in die Unterfamilie S8B eingeordnet (**Abbildung 2**). Die Bezeichnung Proproteinkonvertasen leitet sich von den biochemischen Reaktionen ab, die diese Enzyme katalysieren: Sie sind für die posttranslationale proteolytische Reifung zahlreicher Vorläuferproteine (Proproteine) zuständig. Diese Prozessierung führt meistens zur Aktivierung, in seltenen Fällen aber auch zur Deaktivierung der entsprechenden Substrate. Die PC-Aktivität spielt eine zentrale Rolle in zahlreichen Stoffwechselprozessen. Die deregulierte Prozessierung mancher endogener, aber auch die Spaltung einiger exogener (viraler oder bakterieller) Proproteine kann im Gegensatz dazu pathologische Auswirkungen haben.

Die Mitglieder der Familie S8A spalten ihre Substrate bevorzugt hinter hydrophoben Resten und spielen eine wichtige Rolle u.a. bei der Cholesterol- und Lipidhomöostase (Seidah and Prat, 2012). SKI-1 ist ubiquitär im Organismus verteilt und aktiviert mehrere membrangebundene Transkriptionsfaktoren und weitere Proteine, die den Golgi-Apparat durchwandern. Neben der Cholesterol- und Fettsäuresynthese kontrolliert dieses Enzym auch Prozesse wie die Mineralisation der Knochen oder das Überleben von Neuronen. PCSK9 kommt in der Leber, im Darm und in der Niere vor. In einem autokatalytischen Reifeprozess kann es sich intramolekular spalten. Dieser Schritt führt zur Selbstinaktivierung des Enzyms – es kann keine weiteren Substrate mehr prozessieren. Stattdessen bindet PCSK9 an spezifische zelluläre Oberflächenrezeptoren, z.B. an den LDL-Rezeptor, und fördert dabei dessen endosomalen bzw. lysosomalen Abbau.

Die furinartigen Proteasen der Unterfamilie S8B besitzen eine andere Substratspezifität und spalten bevorzugt nach gepaart basischen Aminosäuren (Seidah and Prat, 2012; Thomas, 2002).

Die sieben S8B-Familienmitglieder besitzen eine hohe Sequenzhomologie und sind ähnlich aufgebaut (die schematische Anordnung der Domänen des Furin ist in **Abbildung 4**, S. 8, gezeigt). *N*-terminal befindet sich ein Signalpeptid, das die naszierende Polypeptidkette in das endoplasmatische Retikulum (ER) leitet und gleich danach durch Signalpeptidasen abgespalten wird. Daran schließt sich die Prodomäne an, die eine essenzielle Rolle als intramolekulares Chaperon bei der Faltung, Aktivierung und dem Transport der PCs sowie der Regulierung ihrer Aktivität spielt. Die Prodomäne wird im Rahmen der proteolytischen Autoaktivierung abgespalten. *C*-terminal der Prodomäne befindet sich die katalytische Domäne, die die drei Aminosäuren der katalytischen Triade Serin368, Histidin194 und Aspartat153 enthält. Es folgt die hochkonservierte P-Domäne, die für die Enzymaktivität der furinartigen PCs ebenso unerlässlich ist. Über die P-Domäne erfolgt u.a. die pH- und Calcium-abhängige Regulierung der enzymatischen Aktivität. Furin und PC7 sind Transmembranproteine des Typs I und besitzen dementsprechend eine Transmembran- und eine *C*-terminale zytoplasmatische Domäne, die bei den löslichen PCs (PC1/3, PC2, PC4 und PACE4) fehlen. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen der PC5/6. PC5/6A ist ein lösliches Protein, PC5/6B dagegen in der Zellmembran oder in der Membran intrazellulärer Kompartimente verankert. Die höchste Sequenzhomologie der PCs ist in der katalytischen Domäne zu finden. Dies könnte die in einigen Fällen ausgeprägte Redundanz in den Funktionen dieser Enzyme erklären.

Jedoch unterscheiden sich die kexinähnlichen PCs teilweise in ihrer intrazellulären und Gewebelokalisation, wodurch in einigen Fällen eine Selektivität bestimmter PCs für spezifische Substrate resultiert (Seidah and Prat, 2012). Die katalytische Domäne aller PCs ist außerhalb des Zytoplasmas (entweder auf der Zelloberfläche oder im Lumen intrazellulärer Kompartimente) lokalisiert; einige PCs werden auch in den extrazellulären Raum sekretiert (**Abbildung 3**). PC1/3 und PC2 befinden sich meistens in sauren sekretorischen Granula (pH ca. 5 (Machen et al., 2003)) neuronaler und endokriner Zellen und prozessieren Vorläufer vieler Polypeptidhormone wie Pro-GHRH, Pro-ACTH, Pro-GLP1 und Pro-GLP2 (PC1/3-spezifisch), Pro- β -Endorphin und Proglucagon (PC2-spezifisch) sowie Proinsulin (beide Enzyme spalten spezifisch an zwei verschiedenen Stellen (Kaufmann et al., 1995)). Dabei werden diese Hormone in ihre aktive Form überführt. PC1/3 und PC2 erreichen ihr Aktivitätsoptimum im sauren Milieu der sekretorischen Vesikel. Dagegen sind alle anderen PCs im schwach sauren bis neutralen Bereich am wirksamsten. PC4 kommt in Keimzellen und Plazenta vor und ist vermutlich auf der Zelloberfläche aktiv. In ihren Funktionen besitzen Furin, PC5/6, PACE4 und zum Teil auch PC7 eine relativ hohe Redundanz. Furin und PC7 sind im Körper ubiquitär und PC5/6 sowie PACE4 weit verbreitet (PC5/6: u.a. in der Niere und der Nebennierenrinde, im Darm und in den Ovarien; PACE4: u.a. in der Niere, im Darm, in Muskeln, im Herzen, im Kleinhirn und in der Hypophyse). Sie können in intrazellulären

Kompartimenten wie im Golgi-Apparat oder im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), aber auch an der Zelloberfläche lokalisiert sein. Sie aktivieren viele endogene Vorläufer unterschiedlicher Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Enzyme, aber auch Pathogenitätsfaktoren viralen oder bakteriellen Ursprungs.

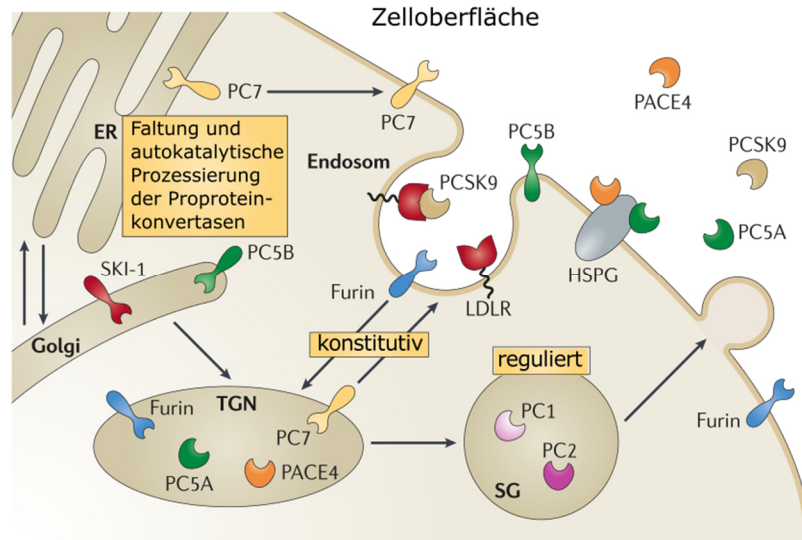


Abbildung 3: Subzelluläre Lokalisation der PCs. Der regulierte Weg in neuroendokrinen Zellen umfasst den Transport vom TGN zu den sekretorischen Granula (SG), die mittels einer extrazellulären Calcium-Zufuhr zur Exozytose stimuliert werden können. Der konstitutive Weg führt vom TGN zur basolateralen Zelloberfläche. Die Sekretion über den konstitutiven Weg wird nicht durch Calcium stimuliert. Nach Verlassen des ER durchlaufen die meisten furinartigen PCs den Golgi-Apparat in Richtung des TGN. Von dieser Verzweigungsstelle aus werden PC1/3 und PC2 im Rahmen des regulierten Wegs in sekretorischen Granula (SG) verpackt, wo sie aktiviert werden, Peptidhormone prozessieren und Signale der regulierten Sekretion erwarten. Im Gegensatz dazu erreichen die konstitutiv sezernierten PCs Furin, PC5/6 und PACE4 vom TGN aus die Zelloberfläche. Auch PC7 kann zur Zellmembran gelangen – entweder über das TGN oder durch einen unkonventionellen Sekretionsweg direkt aus dem ER. Durch Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) werden PC5/6A und PACE4 an der Zelloberfläche und/oder in der extrazellulären Matrix gehalten. Die membrangebundenen PCs Furin, PC5/6B und PC7 können über Endosomen wieder in das TGN gelangen. Das aktivierte membrangebundene SKI-1 ist am stärksten im *cis*- und mittleren Golgi-Apparat lokalisiert, von wo aus es zu abbauenden Lysosomen geschickt wird. SKI-1 kann in der Regel nicht an die Zelloberfläche gelangen. PCSK9 wird aus dem TGN direkt in den extrazellulären Raum in Form eines enzymatisch inaktiven nichtkovalenten Komplexes der Protease mit ihrem autoinhibitorischen Prosegment sezerniert. Dessen Bindung an den *low-density lipoprotein*-Rezeptor (LDLR) auf der Zelloberfläche bewirkt eine endozytische Internalisierung und anschließenden Abbau des Rezeptors in Lysosomen. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und deren Beschriftung angepasst (Seidah and Prat, 2012).

Verschiedene *knockout*-Studien (Creemers and Khatib, 2008; Seidah and Prat, 2012; Thomas, 2002) weisen auf die essenzielle Rolle der PCs in zahlreichen vitalen biologischen Prozessen hin.

Furin-, PC5/6-, PACE4- und SKI-1-*knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig. Der Verlust von PC1/3- und PC2 führt zu schweren Wachstumsstörungen, während durch das Fehlen von PC4 die Fertilität beeinträchtigt wird, besonders in männlichen Mäusen. Interessanterweise bewirkt der *knockout* des PC7-Gens keine schwerwiegenden Anomalien. Die einzigen beobachteten Effekte sind Thymusdefekte und Angstverlust. Der Phänotyp der PCSK9-*knockout*-Mäuse zeichnet sich durch Hypcholesterinämie aus.

Auf der anderen Seite deuten die *knockout*-Experimente und die physiologischen Funktionen der PCs auch darauf hin, dass einige dieser Enzyme als relevante Zielmoleküle zur Entwicklung neuer Wirkstoffe für Erwachsene dienen könnten. PACE4-Inhibitoren sind beispielsweise potenzielle Wirkstoffe gegen Arthritis oder bestimmte Krebsarten, vor allem Prostatakarzinome (Kwiatkowska et al., 2016; Kwiatkowska et al., 2014; Lepek et al., 2017). Die Hemmung der Bindung des PCSK9 an den LDL-Rezeptor ist eine neuartige Möglichkeit zur Therapie der Hypercholesterinämie. Derzeit sind in der EU und den USA zwei gegen PCSK9 gerichtete monoklonale Antikörper zugelassen (Evolocumab und Alirocumab) (Gouni-Berthold et al., 2016).

Um die Effekte eines Furinmangels in erwachsenen Mäusen beobachten zu können, wurde ein induzierbares leberspezifisches Furin-*knockout*-Mausmodell entwickelt (Roebroek et al., 2004). Im Gegensatz zum kompletten Furin-*knockout* wurden bei diesen Mäusen keine signifikanten Beeinträchtigungen beobachtet. Für die proteolytische Aktivierung vieler Proproteine wurde eine partielle bis komplette Redundanz mit verwandten PCs festgestellt, wobei bei keinem der Furinsubstrate eine vollständige Hemmung der Spaltung beobachtet wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Furinhemmung im Rahmen einer zeitlich begrenzten medikamentösen Behandlung ohne gravierende Nebenwirkungen tolerierbar sein sollte. Die physiologischen und pathologischen Funktionen des Furin sowie sein Potenzial als Target für neuartige Therapien werden im nächsten Kapitel näher erläutert.

1.3 Furin

Mit der Entdeckung des Proinsulins 1967 (Steiner et al., 1967) wurde postuliert, dass biologisch aktive Peptidhormone aus längeren Vorläuferproteinen durch posttranslationale proteolytische Modifikation entstehen. Intensive Untersuchungen in den folgenden fast 20 Jahren bestätigten, dass praktisch alle Peptidhormone, zahlreiche bioaktive Proteine und Rezeptoren sowie viele bakterielle Toxine und virale Hüllglykoproteine durch proteolytische Spaltung hinter zwei basischen Aminosäureresten, vor allem nach –Lys-Arg- oder –Arg-Arg-Sequenzen, aus Proformen aktiviert werden (Thomas, 2002). Die Endoprotease Kexin aus *Saccharomyces cerevisiae* war das erste Enzym, für das diese Substratspezifität festgestellt wurde (Julius et al., 1984; Thomas et al., 1988).

Mit einer ca. 50-prozentigen Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne des Kexin wurde Furin 1989 als erste humane PC erkannt (Fuller et al., 1989) und kurze Zeit später dessen Aktivität nachgewiesen (van de Ven et al., 1990). Furin spaltet bevorzugt hinter Sequenzen mit dem Konsensusmotiv -Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg↓-Xaa-, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure steht und ↓ die Spaltstelle kennzeichnet (Thomas, 2002). Andererseits können auch einige Sequenzen gespalten werden, bei denen die basischen Reste in P2- oder P4-Position fehlen. Jedoch besitzen diese Substrate häufig einen basischen Rest in P6-Position (Anderson et al., 1997; Rockwell et al., 2002).

1.3.1 Struktur, Aktivierung und intrazellulärer Transport

Das Typ I-Transmembranprotein Furin kommt in allen Wirbeltieren und vielen wirbellosen Tieren vor (Thomas, 2002). Das Gen wird ubiquitär exprimiert und Furin entsteht wie viele andere biologisch aktive Proteine zunächst am rauen ER als Vorstufe mit einer Länge von 794 Aminosäuren. Diese Präproform besteht aus dem luminalen aminoterminalen Signalpeptid, der Prodomäne, der subtilisinähnlichen katalytischen Domäne, der P-Domäne, der Cys-reichen Region, der Transmembrandomäne und der carboxyterminalen zytoplasmatischen Domäne (**Abbildung 4A**). Die Umwandlung der Vorstufe in das aktive Enzym umfasst mehrere Prozesse.

Das Signalpeptid lenkt das naszierende Präprofurin in das Lumen des ER und wird noch während der Translation durch Signalpeptidasen hinter Ala24 abgespalten (Anderson et al., 1997). Die Prodomäne fungiert als intramolekulares Chaperon und ermöglicht die korrekte Faltung und Aktivierung der katalytischen Domäne (Thomas, 2002). Anschließend findet eine intramolekulare (Leduc et al., 1992) proteolytische Spaltung am C-Terminus der Prodomäne hinter der Sequenz -Arg104-Thr-Lys-Arg107↓ statt. Im neutralen Milieu des ER (pH 7.2 – 7.5 (Machen et al., 2003)) bleibt die nun abgespaltene Prodomäne mit Furin assoziiert und dient als Autoinhibitor. Dieser Komplex wird über den Golgi-Apparat (pH 6.2 – 6.6) in das TGN (pH 5.9) transportiert. Die saure Umgebung im TGN ermöglicht eine zweite intramolekulare Spaltung hinter der Sequenz -Arg70-Gly-Val-Thr-Lys-Arg75↓ innerhalb des Propeptids und bewirkt dessen schnelle Dissoziation (Anderson et al., 1997).

Vom TGN aus kann das endgültig aktivierte Furin unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente des sekretorischen Wegs (Endosomen, sekretorische Granula) und auch die Zellmembran erreichen, kann aber von dort aus auch in das TGN zurückgelangen (Thomas, 2002). Dieser Transport wird über die 56 Aminosäuren lange C-terminale zytoplasmatische Domäne reguliert. Verschiedene Segmente innerhalb dieser Domäne vermitteln die Bindung bestimmter Proteine, die letztendlich die Sortierung des Furin innerhalb der Zelle steuern (**Abbildung 4B**). Der

zyklische Transport durch mehrere Zellkompartimente sowie das ubiquitäre Vorkommen ermöglichen dem Furin die Prozessierung einer breiten Palette von Substraten, worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

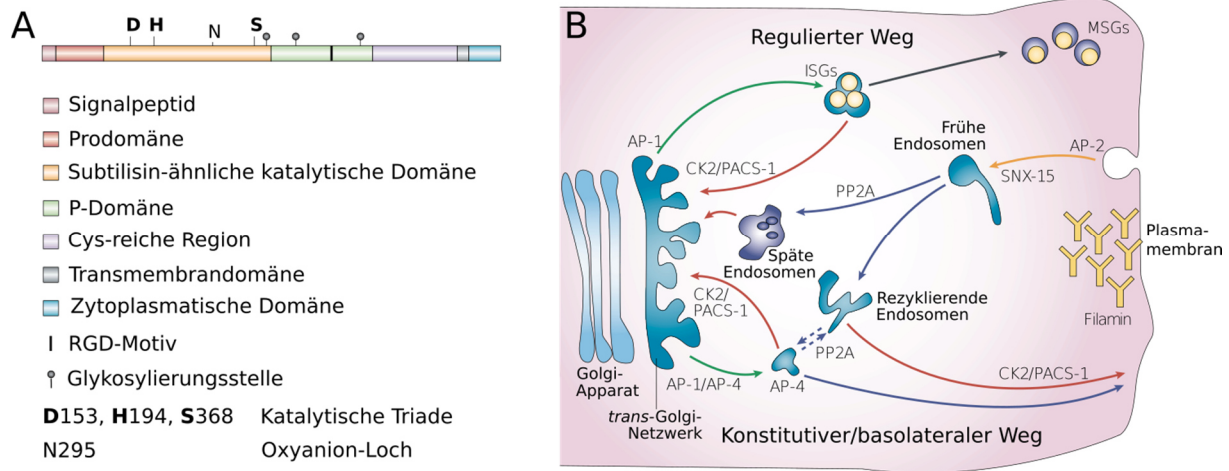


Abbildung 4: **A:** Schematische Anordnung der Domänen des Präprofurin; **B:** Intrazellulärer Transport des Furin. Der regulierte Weg in neuroendokrinen Zellen umfasst den Transport vom TGN über die unreifen (*immature*, ISGs) zu den Peptidhormon-haltigen, reifen (*mature*) sekretorischen Granula (MSGs), die mittels einer extrazellulären Calcium-Zufuhr zur Exozytose stimuliert werden können. Der konstitutive Weg führt vom TGN zur basolateralen Zelloberfläche. Die Sekretion über den konstitutiven Weg wird nicht durch Calcium stimuliert. Im Rahmen des regulierten Wegs wird die Sortierung des Furin aus dem TGN zu ISGs durch Bindung des Adapterproteins-1 (AP-1) an ein hydrophobes Motiv innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Furin vermittelt. *Phosphofurin acidic cluster sorting protein-1* (PACS-1) vermittelt die Bindung des AP-1 an das *casein kinase 2* (CK2)-*phosphorylated furin acidic cluster* innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Furin. Dadurch wird Furin aus ISGs vor ihrer Reifung in das TGN zurückgewonnen. Im Rahmen des konstitutiven Wegs wird Furin aus dem TGN durch Bindung an AP-1 zu Endosomen transportiert. Der Rücktransport aus Endosomen zum TGN erfolgt mittels PACS-1/AP-1. Die Bindung an AP-4 bewirkt die Translokation des Furin aus TGN oder Endosomen zur Zelloberfläche. An der Plasmamembran wird Furin durch Filamin, ein Protein des Zytoskeletts, gebunden. Die Dynamin/Clathrin-abhängige Internalisierung des Furin wird durch die Bindung des AP-2 eingeleitet. Der Transport durch Endosomen wird durch *sorting nexin-15* (SNX-15) reguliert. In frühen Endosomen kann Furin durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert und über späte Endosomen zum TGN gebracht werden. Alternativ kann CK 2-phosphoryliertes Furin aus frühen Endosomen PACS-1-vermittelt zurück zur Zellmembran transportiert werden. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und deren Beschriftung angepasst (Thomas, 2002).

1.3.2 Physiologische und pathologische Funktionen

Wie alle anderen PCs ist Furin strikt Calcium-abhängig. Für volle Enzymaktivität wird eine Ca^{2+} -Konzentration von etwa 1 mmol/L benötigt (Thomas, 2002). Auf dem Molekül befinden sich drei Ca^{2+} -Bindestellen (Dahms et al., 2014). Passend zur unterschiedlichen Lokalisation innerhalb

der Zelle besitzt Furin ein breites pH-Optimum zwischen 5 und 8 (Thomas, 2002). Wie bereits im Falle der zweiten Spaltung nach Arg75 bei der autokatalytischen Aktivierung erwähnt, kann Furin – je nach Zellkompartiment und pH-Bedingungen – auch Substrate prozessieren, deren Spaltsequenzen sich vom optimalen Konsensusmotiv -Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg↓-Xaa- unterscheiden. Andererseits werden auch einige Proteine, die diese Erkennungssequenz besitzen, nicht durch Furin gespalten (Nakayama, 1997; Rockwell et al., 2002). Jedoch existiert in allen bisher untersuchten natürlichen Furinsubstraten ein Arginin in P1-Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger (Schechter and Berger, 1967)). Dies wurde auch durch entsprechende *in vitro*-Studien bestätigt. Die basische P2-Aminosäure spielt dagegen eine wesentlich geringere Rolle für die Furinspaltung. Die meisten *in vivo* vorkommenden Substrate haben zwar ein Arginin oder Lysin an dieser Stelle, es gibt aber auch einige Ausnahmen (Rockwell et al., 2002). Das Vorhandensein eines Arginins an der P4-Stelle ist ebenfalls sehr wichtig, allerdings können basische Reste in P2- und/oder P6-Position sein Fehlen kompensieren.

Furin spaltet sehr viele Vorläuferproteine und bewirkt dadurch üblicherweise ihre Aktivierung. Beispiele für körpereigene Furinsubstrate sind Serumproteine wie Proalbumin, Gerinnungsfaktoren wie Pro-Faktor IX und Pro-Faktor X, aber auch das Glykoprotein Pro-von Willebrand-Faktor, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren wie Pro-*insulin-like growth factor* (IGF), Pro-*insulin-like growth factor*-Rezeptor (IGFR) und Insulin-Präprorezeptor, Hormone wie Prorenin, Proendothelin und Pro-Parathormon (Rockwell et al., 2002). In wenigen Fällen kann eine Spaltung durch Furin auch zu einer Inaktivierung bzw. zum Abbau von Proteinen führen, z.B. der endothelialen Lipase (Jin et al., 2005), der PCSK9 (Benjannet et al., 2006; Essalmani et al., 2011) oder in manchen Fällen auch der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) (Cao et al., 2005). Obwohl die Proteasedomänen der verwandten PCs eine 54- bis 70-prozentige Identität zu Furin aufweisen (Thomas, 2002), was die Redundanz dieser Enzyme in zahlreichen Funktionen erklären könnte, wird die Aktivierung der Ac45-Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase in β -Zellen des Pankreas nur durch Furin katalysiert (Louagie et al., 2008). Viele durch PCs katalysierte Reaktionen sind recht komplex und derzeit nur unvollständig untersucht.

Die Aktivität des Furin ist während der Embryogenese essenziell und auch für die Regulation der zellulären Homöostase im Erwachsenenalter bedeutsam (Thomas, 2002). Furin aktiviert beispielsweise Cytokine aus der *transforming growth factor- β* (TGF- β)-Familie, deren biologische Wirkung u.a. im extraembryonalen Gewebe für die Vaskulogenese des *Saccus vitellinus* und im kardialen Mesoderm für die Herzentwicklung und die axiale Rotation erforderlich ist (Constam and Robertson, 2000; Cui et al., 1998; Roebroek et al., 1998). Auf der anderen Seite kann die Prozessierung des TGF- β 1-Vorläufers über einen Rückkopplungsmechanismus die Erhöhung der Furinexpression bewirken. Durch Aktivierung weiterer Enzyme kann es zum verstärkten

Knorpelabbau und der Ausbildung einer rheumatoiden Arthritis kommen (Blanchette et al., 1997; Yamanishi et al., 2002). Im Gegensatz dazu belegen neuere Studien, dass im Rahmen einer bereits bestehenden rheumatoiden Arthritis Furin einen antiinflammatorischen und protektiven Effekt ausübt, vermutlich über den Abbau der MMP-2 (Lin et al., 2012). Die erhöhte Furinbildung in erkrankten Gelenken könnte also als eine körpereigene Schutzreaktion und nicht als Grund für die Erkrankung gedeutet werden.

TGF- β wird auch für den bösartigen Phänotyp der therapieresistenten Glioblastome verantwortlich gemacht, wobei TGF- β 2 die Furinproduktion über einen Rückkopplungsmechanismus erhöht (Ventura et al., 2017).

In manchen Krebsarten ist Furin überexprimiert (Thomas, 2002). Dazu zählen nichtkleinzellige Lungenkarzinome, Plattenepithelkarzinome und Glioblastome (Mbikay et al., 1997). Die erhöhte Furinexpression korreliert auch mit der Überexpression des Furinsubstrates *membrane type I-matrix metalloproteinase* (MT1-MMP) (Bassi et al., 2001a; Bassi et al., 2001b). Dieses Enzym aktiviert wiederum extrazelluläre MMP-2, die das Tumorwachstum und die Neovaskularisation fördert (Sounni et al., 2002). Andererseits ist die durch MT1-MMP/MMP-2 initialisierte Signalkaskade unerlässlich für die Alveolenbildung in der embryonalen Lunge (Kheradmand et al., 2002). Dies ist ein weiteres Beispiel für die vielfältigen Funktionen des Furin mit einerseits physiologischer Bedeutung und andererseits möglichen pathogenen Auswirkungen (Thomas, 2002).

Ein anderes Furinsubstrat, IGF1, wird in Darm-, Brust-, Prostata- und Lungenkarzinomen verstärkt gebildet. Der entsprechende Rezeptor, IGF1R, der ebenfalls durch Furin aktiviert wird, kommt in hoher Dichte auf der Oberfläche dieser Tumorzellen vor (Wu et al., 2002).

Eine erhöhte Furinproduktion wurde zwar bei einigen, aber nicht bei allen Krebsarten festgestellt (Couture et al., 2015). Im Prostatakarzinom ist die Furinexpression im Gegensatz zu anderen PCs herunterreguliert (D'Anjou et al., 2011), und ein Furin-*knockdown* hat keinen Effekt auf die Zellproliferation (Couture et al., 2012). Interessanterweise ist die Überexpression des Furin im Leberzellkarzinom mit einer Reduktion des Tumorwachstums und einer besseren postoperativen krankheitsfreien Überlebensprognose assoziiert (Huang et al., 2012).

Ein weiteres Furinsubstrat ist das Vorläuferprotein des *β -nerve growth factor* (Pro- β -NGF) (Molloy et al., 1999). Je nachdem, ob dieses Protein gespalten wird oder nicht, werden unterschiedliche Signalkaskaden in Neuronen initiiert. Während durch Furin prozessiertes β -NGF das Überleben von Zellen fördert, führt der intakte Vorläufer zur Apoptose (Lee et al., 2001).

Neben körpereigenen Proteinen kann Furin als Wirtsprotease auch exogene Substrate wie einige bakterielle Toxine und virale Glykoproteine spalten. Dadurch werden die Toxine aktiviert bzw. die Virusvermehrung ermöglicht (Bontemps et al., 2007; Couture et al., 2015; Thomas, 2002).

Bakterielle Toxine wie Anthrax-Toxin, Aerolysin und *Clostridium septicum*- α -Toxin werden extrazellulär durch membrangebundenes Furin prozessiert und somit aktiviert. Anthrax-Toxin wird vom Gram-positiven Stäbchen *Bacillus anthracis* produziert und gehört zu den sogenannten AB-Toxinen. Die B-Untereinheiten sind für die Bindung dieser Proteine an spezifische Wirtszellrezeptoren und für den Transport der A-Untereinheiten in das Zytosol zuständig. Die A-Untereinheiten sind enzymatisch aktiv und lösen die eigentliche toxische Wirkung aus. Anthrax-Toxin besteht aus drei einzeln sezernierten Proteinen: Protektives Antigen (PA), Letalfaktor (LF) und Ödemfaktor (EF). Das intakte PA bindet an den Zellrezeptor und wird durch Furin gespalten. Die prozessierte Form bildet einen ringförmigen heptameren Komplex, der LF und/oder EF binden kann. Nach anschließender Endozytose bildet der PA-Komplex eine Pore in der Endosomenmembran, durch die die enzymatisch aktiven Proteine LF und EF das Zellinnere erreichen. Bei Abwesenheit von Furin bleibt die Spaltung des PA aus und das Toxin verliert seine letale Wirkung (Klimpel et al., 1992). Ein weiteres Beispiel, das Aerolysin, wird durch das Gram-negative Stäbchen *Aeromonas hydrophila* freigesetzt und verursacht z.B. Symptome einer Lebensmittelvergiftung. Der Vorläufer dieses Toxins ist ein Furinsubstrat, das in P2-Position der Spaltsequenz keine basische Aminosäure, sondern ein Alanin besitzt. Nach Prozessierung des Vorläufers bildet das aktive Toxin einen ringförmigen heptameren Komplex, der eine Pore in der Wirtszellmembran ausbildet (Abrami et al., 1998). Das vom Gram-positiven Stäbchen *Clostridium septicum* gebildete α -Toxin verursacht Gasgangrän (Gasbrand) und muss wiederum durch Furin aktiviert werden. Das aktive Toxin oligomerisiert, bildet auch eine Pore in der Zellmembran und wirkt dadurch membranschädigend (Gordon et al., 1997).

Die Vorläufer der Toxine *Pseudomonas aeruginosa*-Exotoxin A (PEA), Shiga-Toxin (ST) und Diphtherie-Toxin (DT) werden als intakte Proteine sezerniert, die durch endosomales Furin prozessiert werden, und gehören zu den AB-Toxinen (Garred et al., 1995; Inocencio et al., 1994; Tsuneoka et al., 1993). Die intakten Toxine binden über die B-Domänen (Monomer im Falle des PEA und des DT, Pentamer im Falle des ST) an den Oberflächenrezeptor der Wirtszelle. Nach anschließender Endozytose werden die Toxine durch Furin gespalten; die dabei freigesetzten enzymatisch aktiven A-Untereinheiten (jeweils nur eine Domäne) gelangen über die durch die B-Untereinheiten gebildeten Poren in das Zytosol und lösen toxische Wirkungen aus. Die Spaltsequenzen des Pro-PEA und Pro-ST mit jeweils einem Prolin bzw. Alanin in P2-Position weichen ebenfalls von dem Furin-Konsensusmotiv ab (Rockwell et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, sind Furinspaltungen auch für die Infektiosität und Pathogenität vieler Viren notwendig. Behüllte Viren führen ihr genetisches Material durch einen zweistufigen Prozess in das Innere der Wirtszelle ein. Als Erstes binden sie über entsprechende Rezeptoren an die Membran dieser Zellen. Anschließend kommt es entweder zur direkten Fusion der Virushülle mit der äußeren Zellmembran (z.B. bei Paramyxoviren wie Masernviren) oder in anderen Fällen – erst nach endozytotischer Aufnahme – zur Fusion des Virus mit der Endosomenmembran (z.B. bei den hochpathogenen Vogelinfluenzaviren). Die Fusion ermöglicht die Freisetzung des viralen Erbguts in der Wirtszelle (Mas and Melero, 2013). Die Membranfusion wird durch spezifische Hüllglykoproteine (Fusionsproteine) eingeleitet. Es gibt drei Klassen von Fusionsproteinen (Lescar et al., 2001; White et al., 2008; White and Whittaker, 2016). Nur die ersten zwei benötigen eine proteolytische Prozessierung, um Fusionskompetenz und damit auch ihre Infektiosität zu erlangen. Die proteolytische Spaltung wird in vielen Fällen von einer furinartigen PC im TGN übernommen. Zur Klasse I zählen Fusionsproteine, die aus einem Vorläuferprotein durch Furin oder eine verwandte PC gebildet werden. Fusionsproteine der Klasse II werden nicht direkt durch Furin hydrolysiert. Stattdessen werden sogenannte Begleitproteine durch eine furinartige PC aktiviert, diese sind aber für die Funktion der eigentlichen Fusionsproteine unerlässlich. Einige Beispiele für Klasse I-Fusionsproteine, deren Vorläufer durch Furin gespalten werden, sind das Hämagglutinin (HA) der hochpathogenen Vogelinfluenzaviren (Vorläufer: HA0) (Skehel and Wiley, 2000), gp41 des HIV-1-Virus (Vorläufer: gp160) (Moulard and Decroly, 2000), das F-Protein des respiratorischen Synzytial-Virus (Vorläufer: F0) (Zimmer et al., 2001) und GP2 humanpathogener Ebolaviren (Vorläufer: GP) (Lee and Saphire, 2009). Bekannte Begleitproteine, die zur Aktivität der entsprechenden Klasse II-Fusionsproteine beitragen und durch Furinspaltung entstehen, sind das E2-Protein einiger Alphaviren (Vorläufer: p62) (Rashad et al., 2014; Zhang et al., 2003) und das M-Protein einiger Flaviviren (Vorläufer: prM) (Lindenbach et al., 2007). Klasse III-Fusionsproteine sind z.B. das Glykoprotein G des *Vesicular stomatitis*-Virus und das gB des Herpes-simplex-Virus-1. Der für die Membranfusion erforderliche Konformationswechsel wird durch den niedrigen endosomalen pH-Wert bzw. durch die Bindung an den Wirtszellrezeptor induziert und benötigt keine proteolytische Spaltung des Fusionsproteins (White and Whittaker, 2016).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen in zahlreichen pathologischen Prozessen ist Furin ein attraktives Zielmolekül zur Wirkstoffentwicklung. Obwohl eine dauerhafte Furinhemmung möglicherweise zu Nebenwirkungen führt, ist eine kurzzeitige oder mittelfristige Therapie akuter furinabhängiger Infektionen durch spezifische Hemmstoffe durchaus denkbar. Die antivirale oder antibakterielle Wirkung vieler Furininhibitoren wurde in Zellkulturen belegt. Die im Rahmen dieser

Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente sind in **Kapitel 3.4** zusammengefasst. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten bereits bekannten Furininhibitoren vorgestellt.

1.3.3 Bekannte Furininhibitoren und Anwendungsgebiete

Basierend auf Molekulargewicht und chemischer Struktur können die bisher entwickelten Furininhibitoren in makromolekulare Substanzen, Peptidderivate und nichtpeptidische Verbindungen eingeteilt werden. Ausgewählte Beispiele für jede Inhibitorgruppe sind in **Abbildung 5** aufgeführt.

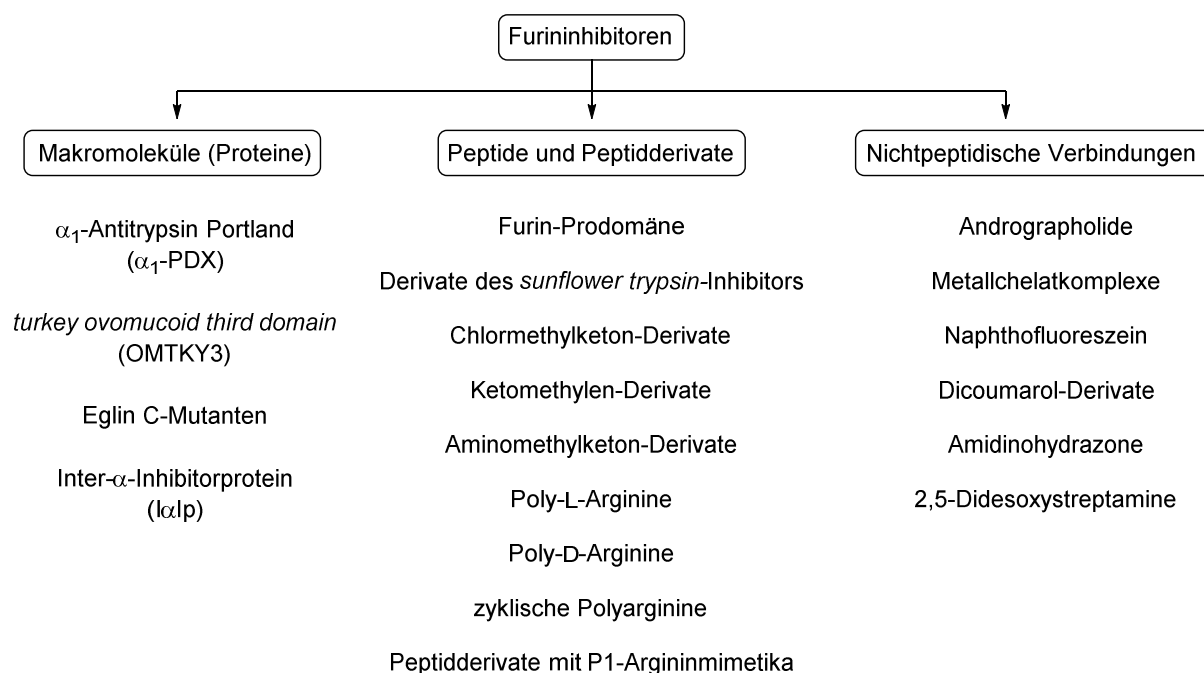


Abbildung 5: Einteilung der Furininhibitoren nach Molekulargewicht und chemischer Struktur.

1.3.3.1 Makromoleküle

Die makromolekularen Furininhibitoren sind meistens von natürlich vorkommenden Hemmstoffen anderer Proteasen abgeleitet. Durch gezielte Mutation dieser Proteine wurden Furinerkennungssequenzen eingebaut und somit Furininhibitoren entwickelt. Die natürliche Sequenz Ala355-Ile-Pro-Met358 des Serpins α₁-Antitrypsin wurde durch Arg355-Ile-Pro-Arg358 ersetzt (Anderson et al., 1993). Der entstandene Suizidinhibitor α₁-Antitrypsin Portland (α₁-PDX) hemmt Furin nach einem *slow-tight-binding*-Mechanismus mit einem K_i -Wert von 1.4 nM (Jean et al., 1998). α₁-PDX hemmt *in vitro* die Spaltung des Pro-β-NGF und des HIV-1 gp160 sowie die Fähigkeit des HIV zur Membranfusion (Anderson et al., 1993). Außerdem schützt dieses Derivat nach Expression in Zellkultur vor der toxischen Wirkung des *Pseudomonas aeruginosa*-

Exotoxins A (Jean et al., 1998). Die Sequenz Ala15-Cys-Thr-Leu18 des Kazal-Typ-Proteaseinhibitors *turkey ovomucoid third domain* (OMTKY3) wurde durch Arg15-Cys-Lys-Arg18 ausgetauscht. Dadurch wurde ein Furininhibitor mit einer Assoziationsgleichgewichtskonstante K_a von 1.1×10^7 L/mol erhalten (Lu et al., 1993). Ein weiteres Beispiel ist der natürlich vorkommende Proteaseinhibitor Eglin C, der aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert wurde und zur Familie der *potato-I*-Inhibitoren gehört. Nach Ersatz der natürlichen Sequenz Pro42-Val-Thr-Leu45 durch Arg42-Val-Lys-Arg45 entstand ein Furininhibitor mit einem K_i -Wert von 1.6 nM (Liu et al., 2004). Dieser zeigt jedoch eine nur temporäre Hemmung, da er durch Furin gespalten wird (Komiyama and Fuller, 2000).

Für einige natürliche Proteaseinhibitoren wurde auch ohne künstliche Modifikationen eine intrinsische Furinhemmung nachgewiesen (Bontemps et al., 2007). Ein Beispiel dafür ist das im menschlichen Blutplasma vorkommende Inter- α -Inhibitorprotein (I α Ip) (Opal et al., 2005), ein Komplex aus zwei schweren und einer leichten Kette. Die leichte Kette ist als Bikunin bekannt (für *Bi-Kunitz Inhibitor*), da sie zwei Inhibitor-domänen vom Kunitz-Typ enthält. Innerhalb der leichten Kette befinden sich typische Furinerkennungssequenzen (Arg-Xaa-Xaa-Arg). Bikunin vermittelt die inhibitorische Wirkung des I α Ip auf viele Serinproteasen im Plasma und ist vermutlich auch für die Furinhemmung verantwortlich. I α Ip zeigt einen effektiven Schutz gegen Anthrax-Toxin in Zellkultur und Mäusen.

Makromolekulare Furininhibitoren werden in biochemischen Experimenten zur Untersuchung furinabhängiger Mechanismen eingesetzt. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts und ihrer eingeschränkten Stabilität sind sie jedoch als Wirkstoffe wenig geeignet. Als Alternative wurden daher auch zahlreiche kürzere Peptidderivate entwickelt.

1.3.3.2 Peptide und Peptidomimetika

Natürlich vorkommende peptidartige Inhibitoren der PCs sind ihre eigenen Prodomänen. Durch rekombinante Expression in *Escherichia coli* wurde die Furin-Prodomäne erhalten. Diese zeigt eine effektive Hemmwirkung auf die Furin-vermittelte Spaltung eines synthetischen fluorogenen Substrates und des HIV-1 gp160 *in vitro* (Zhong et al., 1999). Durch Expression der Furin-Präprodomäne in Plattenepithelkarzinomzelllinien konnte die Proliferation, Kanzerogenität und Invasivität der Tumore in Zellkultur und auch in Mäusen drastisch reduziert werden (Lopez de Cicco et al., 2005). Für die synthetisch hergestellte Prodomäne wurde ein K_i -Wert von 156 nM gegen Furin bestimmt (Basak et al., 2010).

Vor Kurzem wurden weitere Peptidinhibitoren des Furin beschrieben, die vom *sunflower trypsin*-Inhibitor (SFTI) abgeleitet sind (Fittler et al., 2015). SFTI ist einer der kleinsten natürlich vorkommenden peptidischen Proteasehemmstoffe und gehört zur Familie der Bowman-Birk-Inhibitoren (BBI). Die meisten BBIs besitzen einen aus neun Aminosäuren aufgebauten Zyklus, der über eine Disulfidbrücke ausgebildet wird und als P1-Rest ein Lysin enthält (McBride et al., 2002). Bei den modifizierten Furininhibitoren handelt es sich um 11 bis 14 Aminosäuren lange Peptidderivate, die charakteristische Furinerkennungssequenzen enthalten. Je nach Länge stellen die Peptide P5-P6'- bzw. P5-P9'-Segmente dar. Somit adressieren sie auch die sogenannte gestrichene Seite des Enzyms, die sich C-terminal von der Spaltstelle befindet (Nomenklatur nach Schechter und Berger (Schechter and Berger, 1967)). Eine weitere Verlängerung der Sequenzen über den P6'-Rest hinaus hatte keinen Effekt auf die Hemmwirkung. Interessanterweise enthält der potenteste Inhibitor aus dieser Serie ($K_i = 0.49$ nM) ein Lysin in P1-Position (**Abbildung 6**).

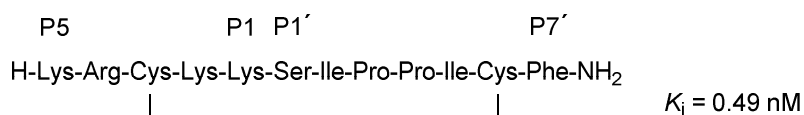


Abbildung 6: Struktur und K_i -Wert eines vom SFTI abgeleiteten Furininhibitors (Fittler et al., 2015).

Eine typische Strategie bei der Entwicklung von Proteaseinhibitoren ist der Ersatz der spaltbaren P1-P1'-Peptidbindung durch eine stabile C-C-Funktion. Durch den Einbau eines C-terminalen Chlormethylketons (CMK) entstehen irreversible Inhibitoren, die zwei kovalente Bindungen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms eingehen. Peptidyl-Chlormethylketone mit zwei basischen Aminosäureresten waren die ersten effektiven Inhibitoren der furinartigen PCs (Garten et al., 1989). Für diese Derivate wurde eine wirksame Hemmung der HA-Spaltung und der Replikation hochpathogener Vogelinfluenzaviren beobachtet (Garten et al., 1994; Garten et al., 1989). Auch die Spaltung des HIV-1 gp160 wurde durch CMK-Inhibitoren effektiv gehemmt (Garten et al., 1994; Hallenberger et al., 1992). Die N-terminale Acylierung mit längeren Fettsäuren wie dem Decanoylrest erhöhte die Wirksamkeit dieser Inhibitoren in Zellen, was auf eine erhöhte Zellpermeabilität zurückgeführt wurde (Angliker et al., 1993; Garten et al., 1994). Im Komplex mit einer dieser Verbindungen, Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (**Abbildung 7**) (Angliker et al., 1993; Garten et al., 1994), wurde die erste Kristallstruktur des Maus-Furin gelöst (Henrich et al., 2003). CMK-Derivate werden zwar in *in vitro*-Experimenten eingesetzt, sind jedoch relativ zytotoxisch und instabil (Garten et al., 1994; Hanson and Harker, 1988). Dies könnte mit ihrer Neigung erklärt werden, mit Nukleophilen unterschiedlicher Art bereitwillig zu reagieren. Aus diesen Gründen sind CMK-Derivate als Wirkstoffe ungeeignet.

Der Austausch der spaltbaren Amidbindung -CONH- durch eine stabile Ketomethylen- $-\Psi[\text{COCH}_2]-$ oder Aminomethylketon-Gruppe $-\Psi[\text{COCH}_2\text{NH}]-$ lieferte kovalent-reversible Furininhibitoren mit K_i -Werten jeweils im submikromolaren und im niedrigen nanomolaren Bereich (**Abbildung 7**) (Angliker, 1995). Diese Strategie ermöglichte auch die Adressierung der gestrichenen Seite des Enzyms durch den Einbau von P1'-, P2'- und P3'-Resten. Die Hemmwirkung dieser zwei Inhibitorklassen konnte jedoch durch weitere C-terminale Verlängerungen im Vergleich zu den in **Abbildung 7** gezeigten Hemmstoffen nicht gesteigert werden. Interessanterweise waren die Aminomethylketon-Derivate bessere Furininhibitoren als die analogen Ketomethylen-Verbindungen. Ursprünglich wurde vermutet, dass der Einbau einer zusätzlichen Methylengruppe im Falle der Aminomethylketone das Peptidrückgrat um ein Atom verlängert und dadurch die Bindung der C-terminalen Inhibitorreste an das Enzym nicht mehr optimal möglich sein sollte.

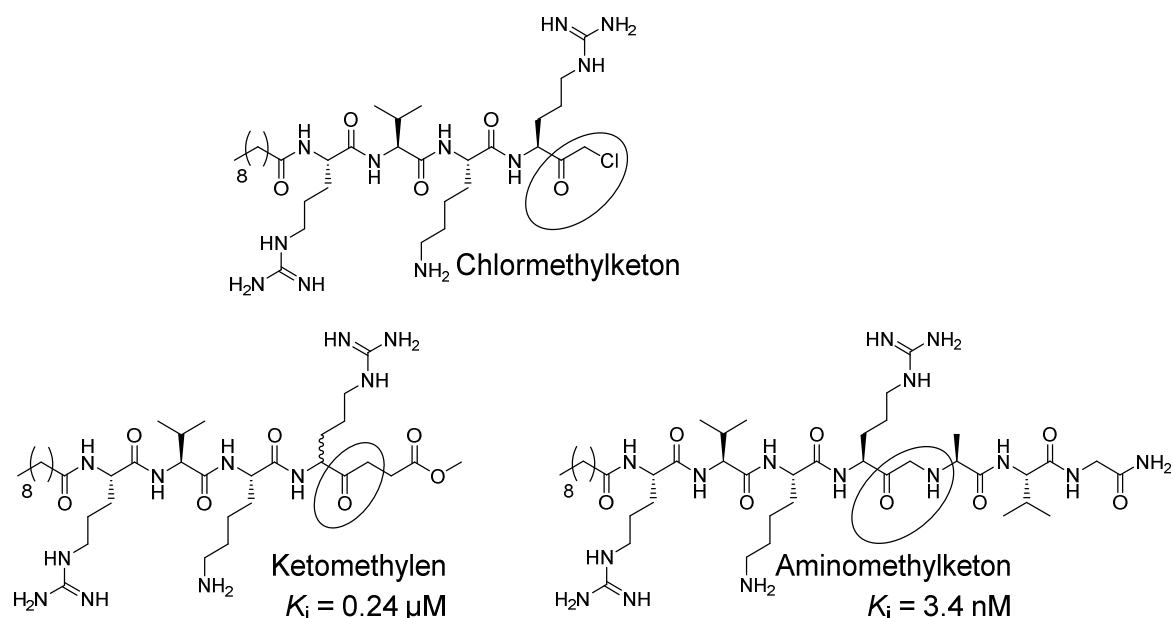


Abbildung 7: Strukturen bekannter Furininhibitoren (Angliker, 1995; Angliker et al., 1993). Sofern bekannt, ist die Inhibitionskonstante unterhalb der jeweiligen Verbindung angegeben.

Mithilfe kombinatorischer Bibliotheken wurde das Hexapeptid H-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-OH als ein relativ wirksamer Furininhibitor ($K_i = 420 \text{ nM}$) identifiziert (Cameron et al., 2000). Durch eine N-terminale Acetylierung und C-terminale Amidierung wurde die Hemmwirkung verringert. Poly-L-Arginine erwiesen sich als noch effektivere Furinhemmstoffe, wurden aber durch das Enzym gespalten. Dies führte zur Synthese der proteolytisch stabilen und relativ wirksamen Poly-D-Arginine (Cameron et al., 2000; Kacprzak et al., 2004). Die Kristallstruktur des Furin zeigt eine Vielzahl saurer Aminosäurereste im

S6-S1-Bereich des aktiven Zentrums (Henrich et al., 2003). Daher ist das aktive Zentrum stark negativ geladen, wodurch polybasische Verbindungen mit hoher Affinität binden. Obwohl die C-terminale Amidierung der L-Derivate zu einer reduzierten Hemmwirkung führte, verbesserte diese Modifizierung die analogen D-Inhibitoren. Hexa-D-Arg-NH₂ (D6R) hemmt die Aktivierung des PEA und des Anthrax-Toxins in Zellkulturen und in Mäusen (Sarac et al., 2002; Sarac et al., 2004). Die Schutzwirkung gegen Anthrax-Toxin durch Nona-D-Arg-NH₂ (D9R) war sogar noch deutlicher ausgeprägt (Kacprzak et al., 2004).

Polyarginine sind auch für ihre zellpenetrierenden Eigenschaften bekannt (Futaki et al., 2001; Lättig-Tünnemann et al., 2011; Wender et al., 2000). In der Regel sind nur kleine relativ hydrophobe Moleküle in der Lage, die Zellmembran durch einfache Diffusion, ohne die Hilfe spezifischer Rezeptoren oder Transportermoleküle, zu passieren. Viele Wirkstoffe, deren Zielmoleküle sich intrazellulär befinden, sind dagegen eher hydrophil, haben ein hohes Molekulargewicht und weisen keine genügende Affinität zu bestimmten Transportsystemen auf. Sie brauchen sogenannte *carrier*, um in die Zelle eingeschleust zu werden. Solche *carrier* sind beispielsweise die zellpenetrierenden Peptide (CPPs) (Heitz et al., 2009; Madani et al., 2011; Milletti, 2012; Reissmann, 2014). Dieser Begriff umfasst eine heterogene Gruppe von Peptiden, die meistens eine Länge von 5-35 Aminosäuren haben und häufig unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind. Sie sind in der Lage, die Zellmembran zu passieren und dabei elektrostatisch oder kovalent gebundene biologisch aktive Moleküle in das Zellinnere zu transportieren (Madani et al., 2011). Die Aufnahmemechanismen sind nicht vollständig geklärt – diskutiert werden sowohl Endozytose als auch unterschiedliche energieunabhängige Prozesse, die auf einer initialen Bindung der positiv geladenen Peptide an negativ geladene Zellmembranbestandteile wie Heparansulfat und Phospholipide beruhen (Madani et al., 2011).

Eins der am genauesten untersuchten CPPs ist das Tat-Protein, ein Transkriptionsaktivator aus HIV-1. Es wurde bewiesen, dass das polybasische Arginin- und Lysin-reiche Segment zwischen den Resten 47 und 57 notwendig und ausreichend für die intrazelluläre Aufnahme des Tat-Proteins ist (Ramos-Molina et al., 2015). Im Vergleich dazu werden reine Polyarginin-Sequenzen noch effektiver internalisiert (Futaki et al., 2001; Wender et al., 2000). Dieser Effekt wird durch eine Zyklisierung der Peptide zusätzlich verstärkt, da die rigidere Struktur der zyklischen Polyarginine zu einem optimalen Abstand zwischen den Guanidinogruppen führt, wodurch die Anzahl der möglichen Wechselwirkungen mit Zellmembranen erhöht wird (Lättig-Tünnemann et al., 2011).

Basierend auf Polyargininen wurden amphiphile zyklische CPPs mit verbesserter Proteolyseresistenz, deutlich gesteigerter Zellpermeabilität und niedriger Zytotoxizität entwickelt (Oh et al., 2014a; Oh et al., 2014b; Qian et al., 2013). Eine Reihe zyklischer CPPs entstand durch

Zyklisierung der linearen Polyarginine und Acylierung mit langkettigen Fettsäuren (Oh et al., 2014a). Eine weitere Gruppe umfasst Arginin- und Tryptophan-reiche Verbindungen (Oh et al., 2014b). Ausgewählte zyklische CPPs wurden auf ihre inhibitorische Wirksamkeit gegen furinartige PCs untersucht (Ramos-Molina et al., 2015). Wie erwartet, sind diese Verbindungen aufgrund ihres polykationischen Charakters signifikante Furinhemmstoffe mit Hemmkonstanten im submikromolaren Bereich (**Abbildung 8**).

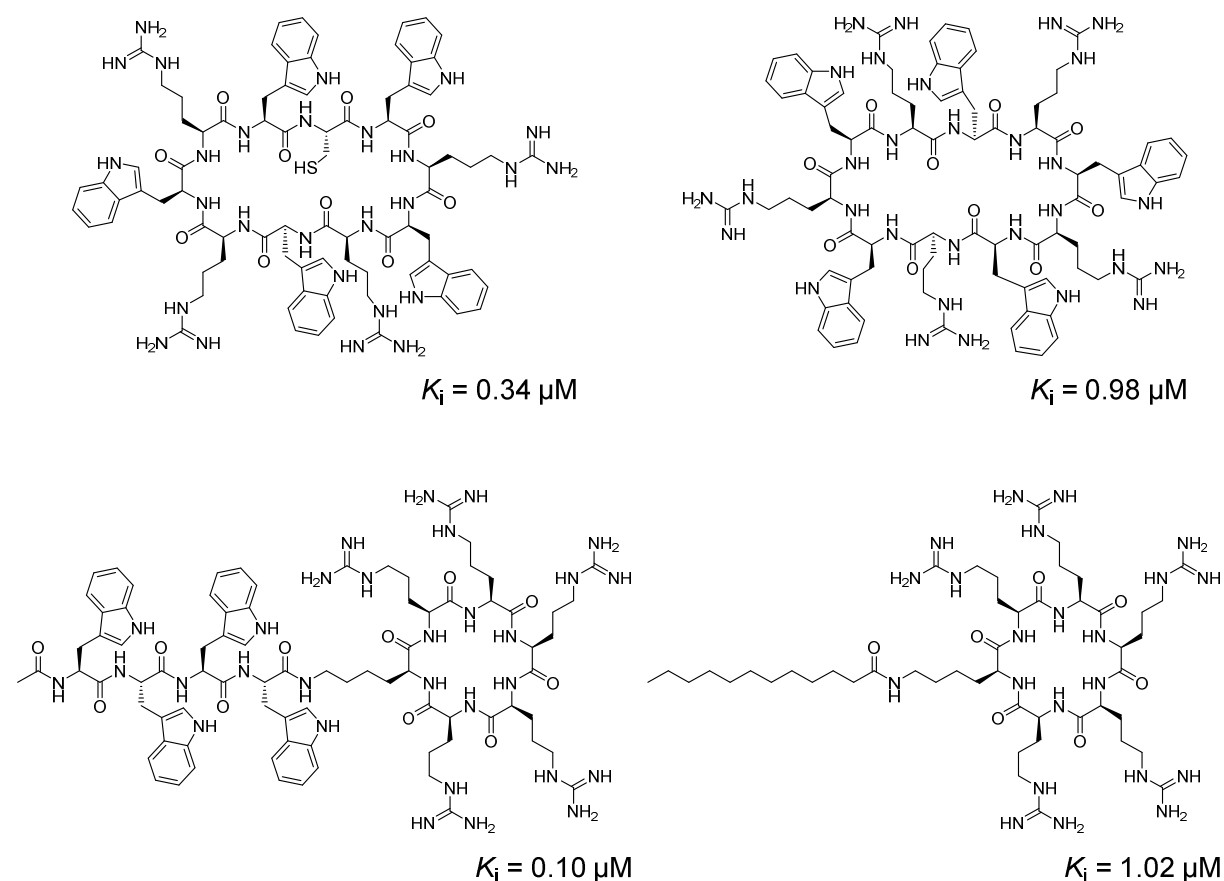


Abbildung 8: Strukturen polybasischer zyklischer CPPs, für die eine Furinhemmung gezeigt wurde (Ramos-Molina et al., 2015).

Ausgehend von der Leitstruktur Acetyl-RARRRKKRT-NH₂ ($K_i = 6.5 \text{ nM}$), die von der natürlichen Spaltsequenz im HA der hochpathogenen Influenzaviren (A H5N1) abgeleitet wurde (Remacle et al., 2010), wurden Furininhibitoren mit unterschiedlichen Argininmimetika in P1-Position hergestellt (Gagnon et al., 2014). Der Einbau des P1-Bausteins 4-Amidinobenzylamid (4-Amba) verbesserte die Hemmwirkung auf Furin ($K_i = 1.9 \text{ nM}$) und die Stabilität in Blutplasma, erhöhte jedoch gleichzeitig die akute Toxizität *in vivo*.

Die Multi-Leucin-Sequenz Acetyl-LLLLRVKR-NH₂ wurde als Grundlage für die Entwicklung neuer PACE4-Inhibitoren angewendet (Kwiatkowska et al., 2014). Der Ersatz des P1-Arg-NH₂

durch den in unserem Arbeitskreis erstmals für Furinhemmstoffe benutzten 4-Amba-Rest (Becker et al., 2010) führte zu einem wirksamen, jedoch unselektiven Inhibitor, der auch Furin mit einer Hemmkonstante von 4.3 nM inhibiert (**Abbildung 9**). Für diese Verbindung wurde im Rahmen einer Toxizitätsuntersuchung in Mäusen eine maximal tolerierbare Dosis (MTD) von 5.5 mg/kg nach intravenöser Gabe bestimmt. Durch den Einbau eines DLeu-Restes in P8-Position (**Abbildung 9**, $K_i = 9.8$ nM) konnte die Verträglichkeit dieses 4-Amba-Inhibitors *in vivo* verbessert werden (MTD = 10 mg/kg) (Kwiatkowska et al., 2016). Eine zusätzliche intramolekulare Zyklisierung, die gleichzeitig als *N*-terminaler Schutz dient, erhöhte die Resistenz gegen proteolytischen Abbau im Plasma (Lepek et al., 2017), die zyklischen Verbindungen sind jedoch etwas schwächere Furinhemmstoffe (**Abbildung 9**).

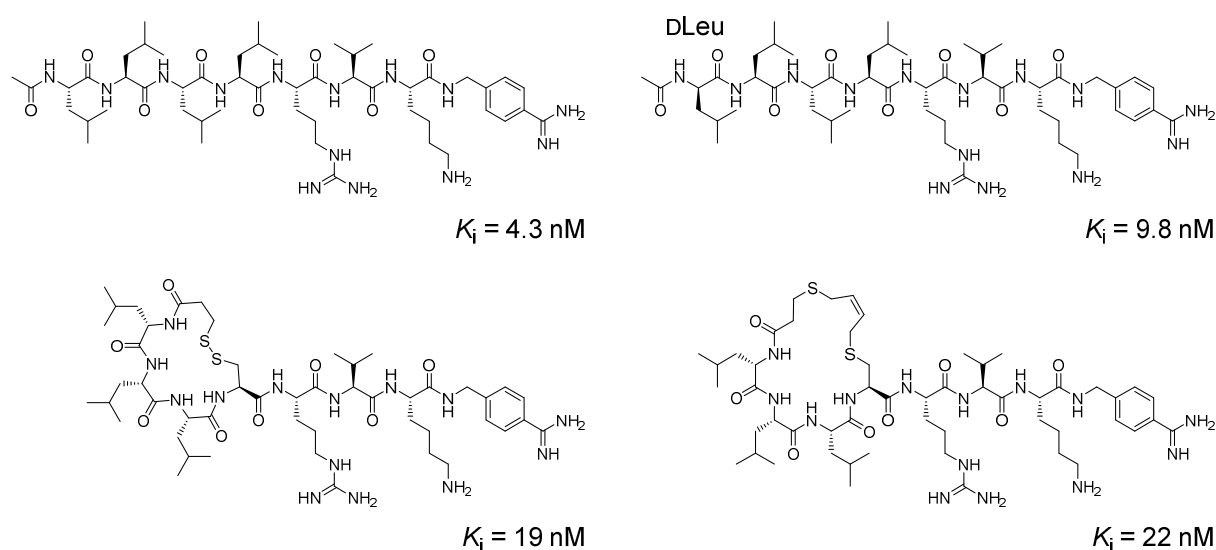


Abbildung 9: Strukturen und Hemmkonstanten linearer und zyklischer peptidischer Furininhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest (Kwiatkowska et al., 2016; Kwiatkowska et al., 2014; Lepek et al., 2017).

Das decarboxylierte P1-Argininmimetikum 4-Amba wurde zuvor bereits in unserem Arbeitskreis mit der bekannten Sequenz Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK kombiniert. Dadurch wurde der im subnanomolaren Bereich wirksame Hemmstoff **1** erhalten (**Abbildung 10**) (Becker et al., 2010). Durch weitere Modifizierungen an den P5- und P3-Resten konnte dessen Hemmwirkung weiter verbessert werden (Verbindungen **2** und **3**, **Abbildung 10**) (Becker et al., 2012). Dies führte letztendlich zur Entwicklung des bisher wirksamsten Furininhibitors mit einem K_i -Wert von 5.5 pM (Inhibitor **4**) (Harden et al., 2015). Diese Verbindung zeigt jedoch ein ungünstiges toxikologisches Profil *in vivo* und bedarf aus diesem Grund weiterer Optimierung (siehe **Kapitel 3.5**).

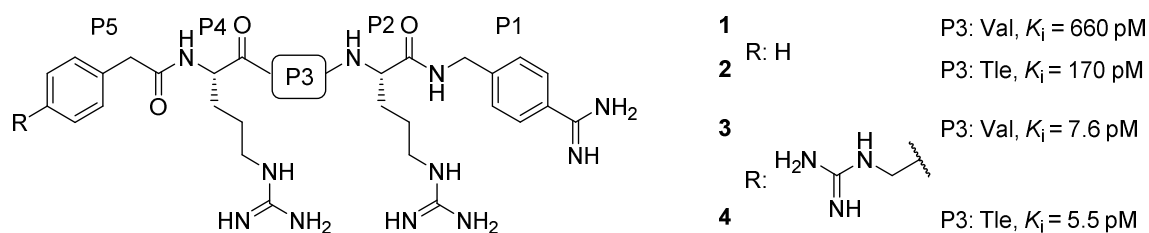


Abbildung 10: Strukturen bekannter Furininhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest (Becker et al., 2012; Becker et al., 2010; Harges et al., 2015).

1.3.3.3 Nichtpeptidische Derivate

Niedermolekulare nichtpeptidische Verbindungen weisen in der Regel eine höhere Stabilität und bessere orale Bioverfügbarkeit als Peptide auf und sind daher für eine Wirkstoffentwicklung besser geeignet. Allerdings gibt es aus dieser Klasse zur Zeit nur wenige wirksame Furininhibitoren.

Für das Diterpenoid Andrographolid (**Abbildung 11**), das aus der Pflanze *Andrographis paniculata* isoliert wurde, wurde nur eine schwache Furinhemmung beobachtet (Basak et al., 1999). Durch Veresterung dieses Naturstoffes mit Bernsteinsäure wurden stärkere Inhibitoren mit K_i -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich erhalten. Als Furininhibitoren mit vergleichbarer Wirksamkeit wurden auch einige Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Chelatkomplexe identifiziert (Podsiadlo et al., 2004). Als Bindungsmechanismus wurde eine Koordination des His194 im aktiven Zentrum durch die Zentralatome postuliert, jedoch konnte das experimentell nicht bestätigt werden. Mithilfe kombinatorischer Bibliotheken wurden Naphthofluorescein und mehrere Dicoumarol-Derivate (**Abbildung 11**) entdeckt und für diese Verbindungen eine Hemmung der Prozessierung von Furinsubstraten in Zellkulturen nachgewiesen (Coppola et al., 2008; Komiyama et al., 2009). Eine Reihe schwach basischer Amidinohydrazon-Derivate hemmen Furin mit K_i -Werten im mikromolaren und submikromolaren Bereich (**Abbildung 11**) (Siellaff et al., 2011). Durch Derivatisierung des Bausteins 2,5-Didesoxystreptamin wurden weitere niedermolekulare Inhibitoren erhalten (**Abbildung 11**), für die Hemmkonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich bestimmt und ein Schutzeffekt gegen Anthrax-Toxin in Zellkultur festgestellt wurde (Jiao et al., 2006). Im Komplex mit einem dieser Inhibitoren (Verbindung 5) wurde eine Kristallstruktur des Furin bestimmt und ein ungewöhnlicher Bindungsmodus festgestellt (Dahms et al., 2017) (siehe nächstes Kapitel).

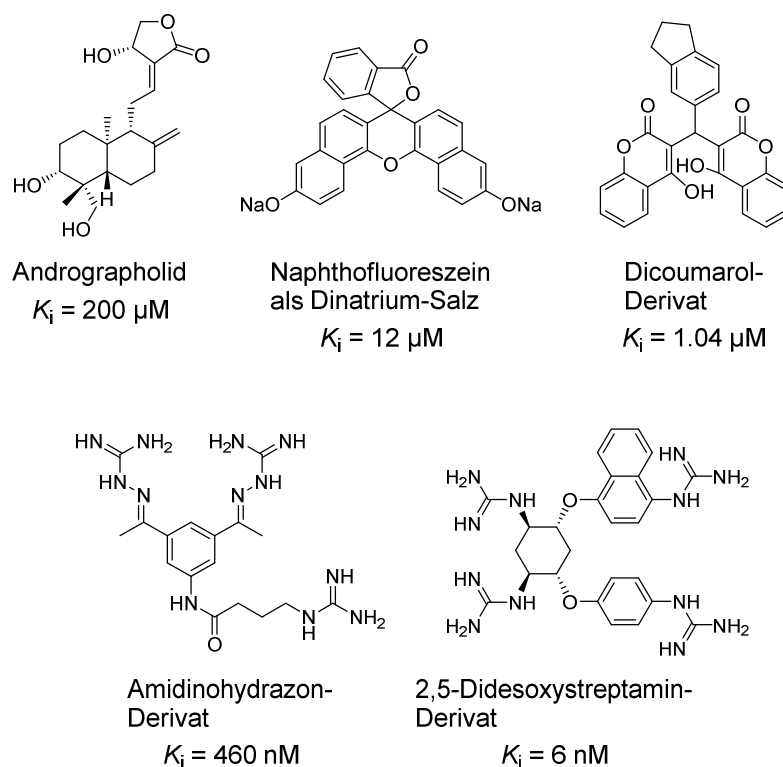
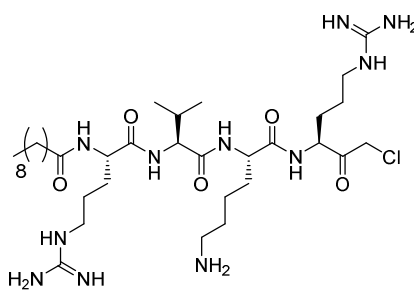
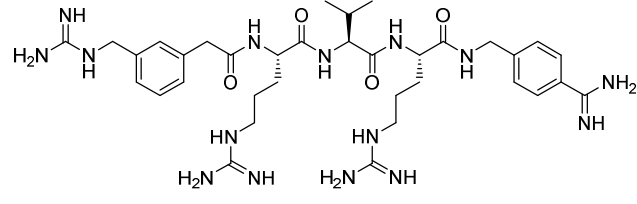
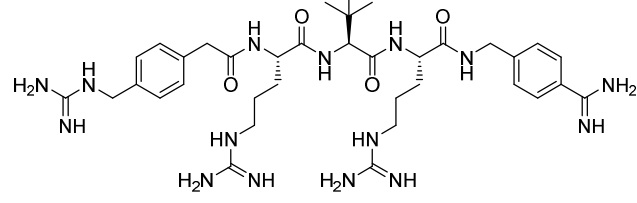
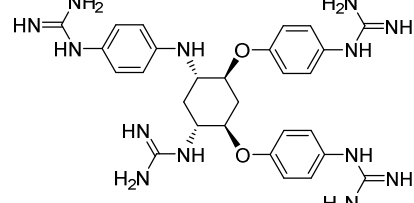


Abbildung 11: Strukturen und Hemmkonstanten nichtpeptidischer Furininhibitoren.

1.3.4 Kristallstrukturen des Furin im Komplex mit niedermolekularen Inhibitoren

Die erste Kristallstruktur des Furin wurde 2003 im Komplex mit dem irreversibel bindenden Inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (**Tabelle 2**) bestimmt (**Abbildung 12**) (Henrich et al., 2003). Dafür wurde eine verkürzte Form des Mausfurin, bestehend aus der katalytischen und der P-Domäne, verwendet. Mithilfe dieser ersten Kristallstruktur konnten wichtige Wechselwirkungen zwischen den beiden Furindomänen sowie die exakte Position von zwei Calcium-Ionen und der Bindungsmodus des Inhibitors aufgeklärt werden.

Tabelle 2: Niedermolekulare Inhibitoren, die zur Bestimmung von Kristallstrukturen des Furin verwendet wurden.

Verbindung	Chemische Struktur	K_i (pM)	PDB-Eintrag
CMK-Inhibitor		-	1P8J
6		8	4OMC
4		5.5	4RYD
5		46 000	5MIM

Die P-Domäne besteht aus acht β -Faltblättern und bindet über zahlreiche hydrophobe und polare Wechselwirkungen an die katalytische Domäne. Die Kristallstruktur deutet darauf hin, dass nur die komplette P-Domäne das stabile β -fassartige Faltungsmuster einnehmen und dadurch die Proteasedomäne stabilisieren kann.

Der Kern der sphärischen Proteasedomäne umfasst ein antiparalleles und sieben parallele β -Faltblätter, flankiert durch sieben α -Helices und zwei β -Haarnadelschleifen. Die Reste Cys211-Cys360 sowie Cys303-Cys333 sind über jeweils eine Disulfidbrücke verbunden. Innerhalb der katalytischen Domäne wurden ursprünglich nur zwei Ca^{2+} -Bindestellen identifiziert (Henrich et al., 2003; Than et al., 2005). Ca^{2+} I, umgeben vom Schleifensegment Ala204-Gly212, ist pentagonal-bipyramidal durch die Seitenketten-Sauerstoffatome von Asn208, Asp115 und Asp162 (zweizählig) sowie die Carbonyl-Sauerstoffatome von Val205, Val210 und Gly212 koordiniert. Ca^{2+} II befindet sich unterhalb der S1-Spezifitätstasche und ist wiederum

pentagonal-bipyramidal von den Carboxylat-Sauerstoffatomen der Reste Asp258, Asp301 und Glu331 (zweizählig) und noch drei Wassermolekülen koordiniert. Diese Reste sind an einem komplexen Wasserstoffbrückennetz beteiligt, das weitere polare Haupt- und Seitenkettenatome sowie die Guanidinogruppe des P1-Arg mit einschließt. Somit spielt Ca^{2+} II eine essenzielle Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung der S1-Tasche (**Abbildung 12**).

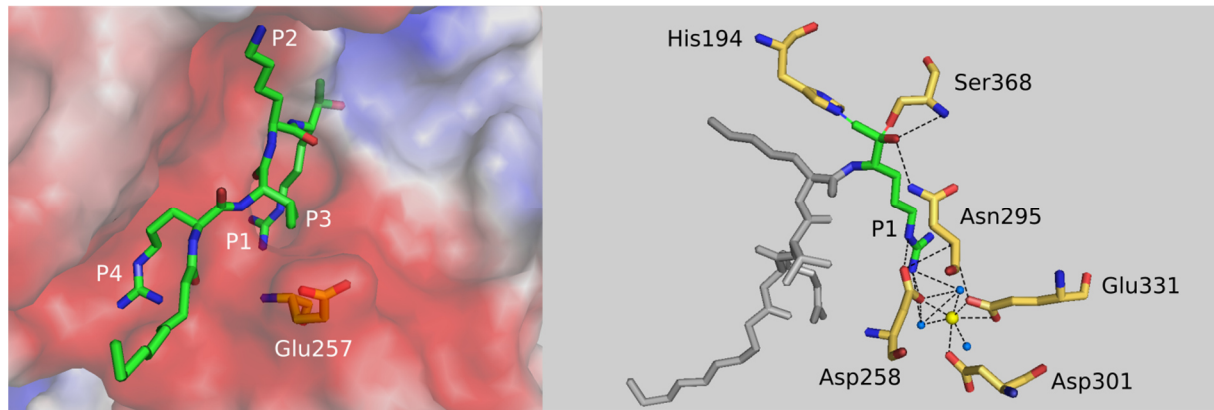


Abbildung 12: Kristallstruktur des Mausfurin im Komplex mit dem Chlormethylketon-Inhibitor (PDB-Eintrag: 1P8J) (Henrich et al., 2003). Die linke Abbildung zeigt die Bindung des vollständigen Inhibitors im aktiven Zentrum, rechts sind polare Interaktionen im Oxyanion-Loch sowie des Ca^{2+} II und des P1-Arg-Restes in der S1-Tasche gezeigt. Die Reste des Inhibitors und die an den gezeigten polaren Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind im Stab-Modell dargestellt (Kohlenstoffatome des Inhibitors grün, Kohlenstoffatome der Furinreste goldgelb, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot; aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das P2-P5-Segment in der linken Abbildung komplett in grau gezeigt). Die Enzymoberfläche in der linken Abbildung ist entsprechend des berechneten elektrostatischen Potentials eingefärbt (positiv blau und negativ rot). Das Ca^{2+} II-Ion ist als hellgelbe und die Wassermoleküle als hellblaue Kugeln abgebildet. Die polaren Interaktionen sind als gestrichelte schwarze Linien, die kovalenten Bindungen zwischen dem Inhibitor und der Aminosäuren His194 und Ser368 als ununterbrochene grüne Linien dargestellt. Die einzelnen Inhibitorreste sind entsprechend der Nomenklatur nach Schechter und Berger gekennzeichnet (Schechter and Berger, 1967).

Das aktive Zentrum ist eine charakteristische Spalte, in deren Zentrum sich die katalytische Triade aus den Resten Asp153, His194 und Ser368 befindet. Auf der Oberfläche des aktiven Zentrums sind zahlreiche negativ geladene saure Reste wie Asp258 und Asp306 (S1-Tasche), Asp154 und Asp191 (S2-Tasche), Glu236 und Glu264 (S4-Tasche), Glu257 und Glu264 (die letztere Aminosäure ist an der Ausbildung der S4- und S5-Tasche beteiligt) sowie Glu230 und Asp233 (S6-Tasche) vorhanden. Im S5-S1-Bereich sind keine basischen Reste zu finden. Erst am äußeren Rand der S1'-Tasche befinden sich drei basische Aminosäuren (Arg193, Arg197 und His364). Der stark saure Charakter des aktiven Zentrums erklärt die hohe Affinität zu positiv geladenen Substraten und Inhibitoren.

Der C-Terminus des CMK-Inhibitors ist über zwei kovalente Bindungen an Furin gebunden (**Abbildung 12**). Nach einem nukleophilen Angriff der Ser368-Hydroxylgruppe an den P1-Carbonyl-Kohlenstoff kommt es zur Bildung eines Hemiketals. Dessen tetrahedrische Struktur ähnelt dem bei der enzymatischen Substratspaltung entstehenden Übergangszustand, der durch Wasserstoffbrücken zu den Resten des Oxyanion-Lochs stabilisiert wird. Das Oxyanion-Loch wird vom Amid-Stickstoff des Ser368 und dem Seitenketten-Amid-Stickstoff des Asn295 ausgebildet (**Abbildung 12**). Die kovalente Hemiketalbildung ist reversibel, jedoch kommt es nach Abspaltung des Chloratoms parallel zur kovalenten, irreversiblen Alkylierung der Imidiazol-Seitenkette des His194 durch die C-terminale Methylengruppe des Inhibitors.

Der peptidische Teil des Hemmstoffs bildet mit dem Ser253-Glu257-Segment eine antiparallel verlaufende β -Faltblattstruktur aus. Die P1-Arg-Seitenkette, umgeben von den Sequenzen Ser253-Gly255 auf der einen und Ser293-Asn295 auf der anderen Seite, ragt tief in die S1-Tasche hinein. Die Seitenketten-Carboxylatgruppen von Asp258 und Asp306 bilden zusammen mit den Carbonylgruppen von Pro256 und Ala292 eine flache Öffnung, die durch die P1-Arg-Guanidinogruppe optimal besetzt werden kann. Dies erklärt die strikte Substratspezifität des Furin für Verbindungen mit Arg in P1-Position. Die ϵ -Aminogruppe des P2-Lys ist von den Sauerstoffatomen des Asp154-Carboxylats, der Asp191-Carbonylgruppe und des Asn192-Carbonsäureamids umgeben. Neben Lys wird in der S2-Tasche auch Arg sehr gut akzeptiert, dessen Bindungsmodus wurde in später veröffentlichten Kristallstrukturen experimentell bestimmt (Dahms et al., 2014; Harges et al., 2015). Die P3-Val-Seitenkette ist ins Lösungsmittel gerichtet, kommt aber relativ nah an die Seitenkette des Glu257. In P3-Position existiert eine Präferenz für Reste mit Verzweigung am C- β -Atom, wie Val, Ile (Becker et al., 2011) und das später identifizierte *tert*-Leucin (Tle) (Harges et al., 2015). Dennoch könnten lange basische P3-Seitenketten günstige Wechselwirkungen zum Glu257-Carboxylat auf der Furinoberfläche (**Abbildung 12**) ausbilden. Vom Rückgrat des P3-Restes werden zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrat des Gly255 ausgebildet. Die Seitenkette des Arginins in P4-Position nimmt eine relativ ungewöhnliche Konformation ein. Deren Guanidinogruppe ist von den Carboxylat-Sauerstoffatomen von Glu236 und Asp264, dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Gly265 und der Hydroxylgruppe des Tyr308 umgeben. Die ausgebildeten Kontakte in der S4-Tasche erklären, dass Arginin der bevorzugte Rest in Furinsubstraten und substratanalogen Inhibitoren ist. Jedoch gibt es auch mehrere Substrate, die keinen Argininrest in P4-Position besitzen (Rockwell et al., 2002).

Eine Kristallstruktur des menschlichen Furin im Komplex mit dem reversiblen kompetitiven Inhibitor **6** ($K_i = 8$ pM, **Tabelle 2**) wurde 2014 bestimmt (**Abbildung 13**) (Dahms et al., 2014).

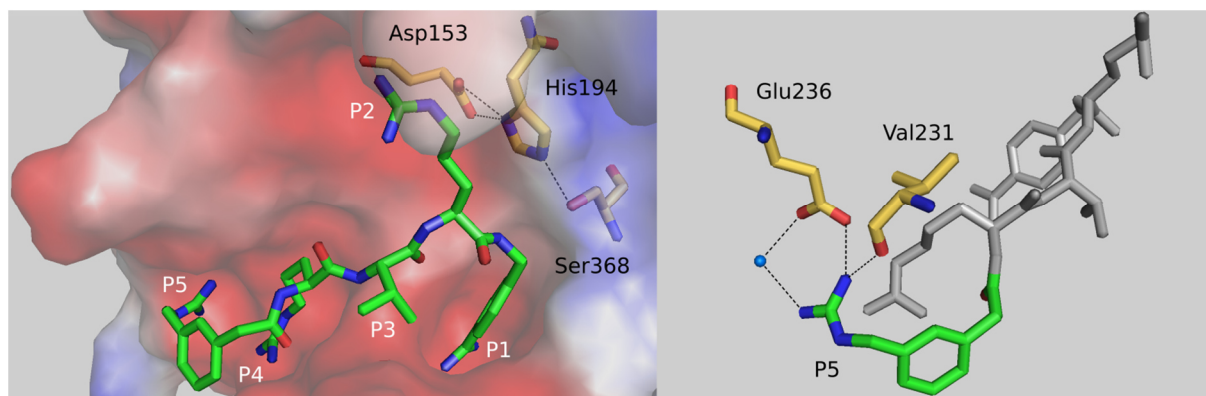


Abbildung 13: Kristallstruktur des humanen Furin im Komplex mit dem Inhibitor **6** (PDB-Eintrag: 4OMC) (Dahms et al., 2014). Die linke Abbildung zeigt die Bindung des vollständigen Inhibitors im aktiven Zentrum, rechts sind die polaren Interaktionen des 3-GMe-Phac-Restes in der S5-Tasche gezeigt. Die Reste des Inhibitors und die an den gezeigten polaren Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind im Stab-Modell dargestellt (Kohlenstoffatome des Inhibitors grün, Kohlenstoffatome der Furinreste goldgelb, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot; aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das P1-P4-Segment in der linken Abbildung komplett in grau gezeigt). Die Enzymoberfläche in der linken Abbildung ist entsprechend des berechneten elektrostatischen Potentials eingefärbt (positiv blau und negativ rot). Die polaren Interaktionen sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt. Die einzelnen Inhibitorreste sind entsprechend der Nomenklatur nach Schechter und Berger gekennzeichnet (Schechter and Berger, 1967).

Mithilfe dieser Struktur konnten eine dritte Ca^{2+} - und eine Na^{+} -Bindestelle identifiziert werden. Ca^{2+} III befindet sich auf der Enzymoberfläche und ist pentagonal-bipyramidal durch die Seitenketten-Sauerstoffatome von Asp174 und Asp179 (zweizählig), den Carbonyl-Sauerstoff des Asp181 und drei Wassermoleküle koordiniert. Der reversibel bindende Inhibitor bildet keine kovalenten Bindungen zu den Resten der katalytischen Triade aus, sodass Asp153, His194 und Ser368 über die typischen Wasserstoffbrücken verbunden sind (**Abbildung 13**). Im Oxyanion-Loch befindet sich ein Wassermolekül, das Ser368 und Asn295 verbrückt. Ähnlich wie die Arg-Seitenkette füllt das decarboxylierte Arg-Mimetikum 4-Amba die tiefe S1-Tasche optimal aus (siehe auch **Abbildung 14**). Dabei bildet das Amidin am Boden der S1-Tasche Wasserstoffbrücken zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Pro256 und Ala292, Salzbrücken zu den Carboxylat-Sauerstoffatomen von Asp258 und Asp306 sowie über zwei verbrückende Wassermoleküle polare Wechselwirkungen zum Ca^{2+} II aus. Der Phenylring interagiert über van der Waals-Wechselwirkungen mit dem Segment Ser253-Gly255 und mit Gly294. Bei der Bindung des rigiden 4-Amba-Restes in der S1-Tasche kommt es im Vergleich zur flexibleren Arg-Seitenkette vermutlich zu geringeren Entropieverlusten. Das könnte die deutlich stärkere Bindungsaffinität der Furininhibitoren mit 4-Amba in P1-Position im Vergleich zu den analogen Verbindungen mit dem aliphatischen P1-Arg-Mimetikum Agmatin erklären (Becker et al., 2010;

Gagnon et al., 2014; Kwiatkowska et al., 2016; Kwiatkowska et al., 2014). Die P2-Arg-Seitenkette zeigt ähnliche Wechselwirkungen in der S2-Tasche wie der Lys-Rest des CMK-Inhibitors. Die Guanidinogruppe ist über eine Salzbrücke mit dem Carboxylat-Sauerstoff des Asp154, über eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonsäureamid-Sauerstoff des Asn192 und über eine wasservermittelte Interaktion mit dem Carboxylat-Sauerstoff des Asp228 verbunden. Im Falle des P2-Lys ist die letztere Wechselwirkung durch eine direkte Wasserstoffbrücke zur Asp191-Carbonylgruppe ersetzt. Die P3-Val- und P4-Arg-Reste nehmen eine ähnliche Konformation wie im Komplex mit dem CMK-Inhibitor ein. Die *N*-terminale Guanidinomethylgruppe liegt parallel zur Peptidbindung zwischen Thr232 und Asp233 und bildet eine Salzbrücke zum einen Carboxylat-Sauerstoff des Glu236, eine über ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zum anderen Carboxylat-Sauerstoff und eine direkte H-Brücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Val231 aus (**Abbildung 13**). Die positiv geladenen P4- und P5-Guanidinogruppen liegen lediglich 4 Å auseinander. Dieser ungewöhnliche Bindungsmodus wird durch das stark negative Potential der Furinoberfläche ermöglicht. Jeder basische P5-Rest, der eine ausreichende Länge besitzt, um Val231 und Glu236 zu erreichen, könnte auf eine ähnliche Weise binden.

Durch *soaking* wurde der Inhibitor **6** aus dem Furin-Komplex durch den Inhibitor **4** ($K_i = 5.5$ pM, **Tabelle 2**) ersetzt. Dadurch wurde die Kristallstruktur des Furin im Komplex mit der Verbindung **4** erhalten (Harden et al., 2015) (**Abbildung 14**). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Inhibitoren wurden in den jeweiligen Kristallstrukturen nahezu identische Interaktionen gefunden.

Die Verbindung **4** unterscheidet sich vom Inhibitor **6** an zwei Stellen: Die Seitenkette in Position P3 trägt eine zusätzliche Methylgruppe und die Guanidinomethylgruppe des P5-Restes befindet sich in *p*- anstatt in *m*-Stellung. Das Rückgrat des Tle in P3-Position bindet analog zum Val an Gly255, die Seitenkette ist ins Lösungsmittel gerichtet.

Interessanterweise bildet die *p*-Guanidinomethylgruppe am P5-Rest des Hemmstoffs **4** die gleichen Wechselwirkungen mit den Furinresten wie bei entsprechender Substitution in *m*-Position im Komplex mit dem Inhibitor **6** aus. Diese Beobachtung erklärt auch die sehr ähnlichen K_i -Werte beider Inhibitoren. Die analoge *o*-substituierte Verbindung ist dagegen deutlich schwächer wirksam ($K_i = 291$ pM). Obwohl für diesen Inhibitor im Komplex mit Furin keine Kristallstruktur verfügbar ist, lassen die starken Unterschiede in den Hemmwirkungen vermuten, dass die beschriebenen charakteristischen Wechselwirkungen in der S5-Tasche mit einer Guanidinomethylgruppe in *o*-Position nicht mehr möglich sind (Becker et al., 2012).

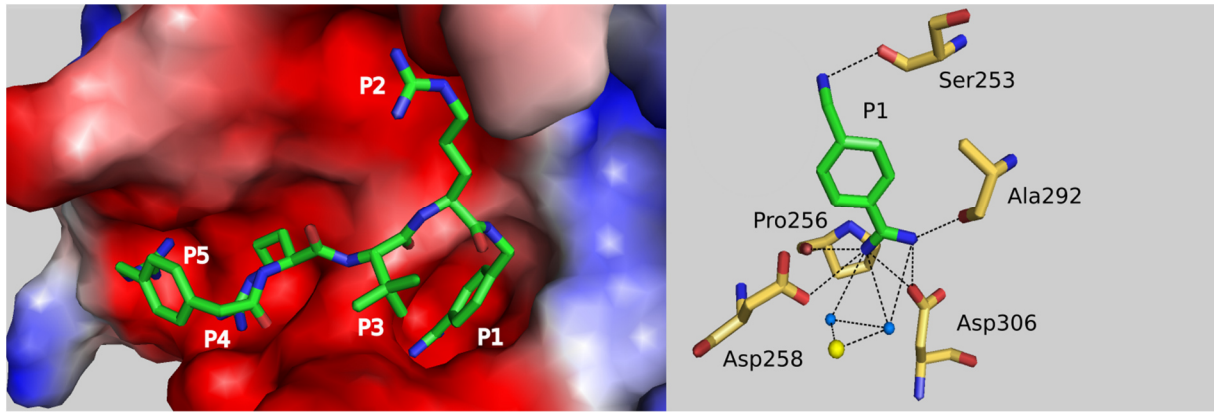


Abbildung 14: Kristallstruktur des humanen Furin im Komplex mit dem Inhibitor **4** (PDB-Eintrag: 4RYD) (Harden et al., 2015). Die linke Abbildung zeigt die Bindung des vollständigen Inhibitors im aktiven Zentrum, rechts sind die polaren Interaktionen des 4-Amba-Restes in der S1-Tasche gezeigt. Die Reste des Inhibitors und die an den gezeigten polaren Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind im Stab-Modell dargestellt (Kohlenstoffatome des Inhibitors grün, Kohlenstoffatome der Furinreste goldgelb, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot). Die Enzymoberfläche in der linken Abbildung ist entsprechend des berechneten elektrostatischen Potentials eingefärbt (positiv blau und negativ rot). Das Ca^{2+} II-Ion ist als hellgelbe und die Wassermoleküle als hellblaue Kugeln abgebildet. Die polaren Interaktionen sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt. Die einzelnen Inhibitorreste sind entsprechend der Nomenklatur nach Schechter und Berger gekennzeichnet (Schechter and Berger, 1967).

Eine Kristallstruktur des ligandenfreien Furin konnte 2016 bestimmt werden (Dahms et al., 2016). In Abwesenheit eines Inhibitors oder Substrats nehmen die katalytische Triade und der Bereich, der für die Substraterkennung zuständig ist, eine inaktive Konformation ein, die als „off“-Zustand bezeichnet wird. Diese Konformation unterscheidet sich von dem ligandengebundenen „on“-Zustand in mehreren Aspekten. Die Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Ser253 und dem Carbonyl-Sauerstoff des Ser368 fehlt im freien Enzym. Dies bewirkt eine Rotation der Ser368-Seitenkette um 180° weg von der S1-Tasche. Dadurch wird die Interaktionsgeometrie der katalytischen Triade geändert und die Ausbildung der typischen Wasserstoffbrücken zwischen Ser368, His194 und Asp153 ist nicht mehr möglich. Auch das Segment Ser253-Pro256, das in direktem Kontakt mit dem Inhibitor im „on“-Zustand steht, befindet sich in einer anderen Konformation im freien Enzym. Interessanterweise bleibt die Orientierung des Asn295 in beiden Zuständen weitestgehend gleich, solange die Ca^{2+} II-Bindetasche besetzt ist. In Abwesenheit des Ca^{2+} II ändert sich die räumliche Position dieses Restes, was den Verlust des Oxyanion-Lochs zur Folge hat. Dies erklärt die strikte Ca^{2+} -Abhängigkeit des Furin. Die Besetzung der Ca^{2+} II-Bindetasche und der S1- und S4-Taschen durch einen Liganden bewirkt den Übergang von der inaktiven Konformation in den „on“-Zustand.

Vor Kurzem wurde eine Kristallstruktur des Furin im Komplex mit dem nichtpeptidischen Inhibitor **5** ($K_i = 46$ nM, **Tabelle 2**) veröffentlicht (Dahms et al., 2017). Zwei Inhibitormoleküle binden an zwei verschiedene Stellen auf der Furinoberfläche (**Abbildung 15**, oben links). Das erste Molekül (I-1) bindet an den Bereich der Furinreste Val231, Leu227 und Trp254 und beeinflusst direkt die katalytische Triade. Die eine Guanidinophenoxy-Gruppe ist an der Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken zu einem Carboxylat-Sauerstoff des Asp153 beteiligt (**Abbildung 15**, unten rechts) und nimmt eine Position ein, die in der aktiven („on“) Konformation des Furin durch His194 besetzt ist. Somit wird die Ausbildung der typischen Wasserstoffbrücke zwischen His194 und Ser368 (**Abbildung 13**) verhindert. Dies hat die Rotation des Ser368 weg von der S1-Tasche zur Folge. In der Kristallstruktur sind zwei mögliche Orientierungen für diesen Rest sichtbar (**Abbildung 15**, oben rechts). In der einen Orientierung ist die Hydroxylgruppe der Seitenkette über Wasserstoffbrücken mit dem Carbonsäureamid-Stickstoff des Asn295, dem Carbonyl-Sauerstoff des Ser253 und der Guanidinophenoxy-Gruppe verbunden. Die andere Konformation wird durch eine direkte Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff des Thr365 und eine über ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zu einer der Guanidinophenoxy-Gruppen stabilisiert. Die andere Guanidinophenoxy-Gruppe des Inhibitors ist in der S4-Tasche verankert und wird durch Wasserstoffbrücken zu den Carboxylat-Sauerstoffatomen von Asp264 und Glu236, zur Phenoxy-Gruppe des Tyr308 und zu drei Wassermolekülen fixiert (**Abbildung 15**, unten rechts). Die Phenylringe der beiden Guanidinophenoxy-Gruppen sowie der Cyclohexan-Kern interagieren mittels hydrophober Wechselwirkungen mit dem Enzym. Der Guanidinophenylamino-Substituent und die freie Guanidinogruppe sind in das Lösungsmittel gerichtet und sind nicht an der Bindung des Inhibitors beteiligt.

Das zweite Molekül des Inhibitors **5** (I-2) bindet vermutlich mit deutlich reduzierter Affinität an Furin. Die Bindung wird durch van der Waals-Wechselwirkungen mit dem Asp228-Glu230-Schleifensegment des Furin und durch zusätzliche polare Interaktionen zwischen der Guanidinophenylamino-Gruppe des Inhibitors und den Seitenketten-Sauerstoffatomen der Furinreste Asn192 und Asp228 sowie dem Carbonyl-Sauerstoff des Asp191 am Rand der S2-Tasche vermittelt (**Abbildung 15** unten links). Die anderen drei Substituenten bilden keine spezifischen Wechselwirkungen zum Furin aus.

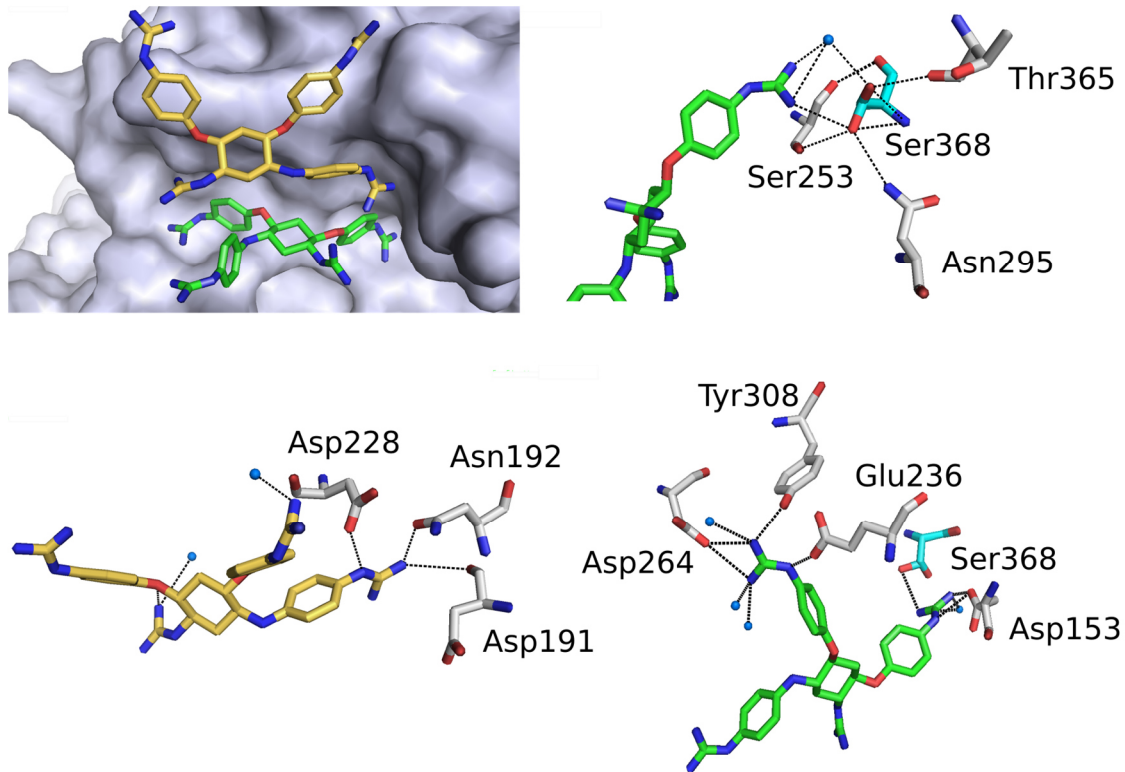


Abbildung 15: Kristallstruktur des Furin im Komplex mit dem Inhibitor **5** (PDB-Eintrag: 5MIM) (Dahms et al., 2017). In dem Komplex binden gleichzeitig zwei Inhibitormoleküle an Furin (oben links). Das wahrscheinlich stärker bindende Inhibitormolekül (I-1, mit grünen Kohlenstoffatomen) ist in einem Bereich zwischen den S4- und S2-Taschen platziert, besetzt jedoch nicht die S1-Tasche. Das zweite Molekül (I-2, mit goldgelben Kohlenstoffatomen) bindet „oberhalb“ des I-1, bildet jedoch weniger polare Wechselwirkungen zum Furin aus. Dessen Bindung ist wahrscheinlich ein Artefakt, da während des *soaking* sehr hohe Inhibitorkonzentrationen eingesetzt werden. Oben rechts sind die polaren Interaktionen des Ser368 und unten die der beiden Inhibitormoleküle gezeigt. Die Inhibitorreste und die an den gezeigten polaren Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind im Stab-Modell dargestellt (Kohlenstoffatome der Inhibitormoleküle grün und goldgelb, Kohlenstoffatome des Ser368 cyan, Kohlenstoffatome der restlichen Aminosäuren grau, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot). Die Wassermoleküle sind als hellblaue Kugeln abgebildet. Die polaren Interaktionen sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt.

Die Kristallstruktur im Komplex mit dem Inhibitor **5** zeigt einen ungewöhnlichen Bindungsmodus und unterscheidet sich deutlich von den typischen Wechselwirkungen der substratanalogen Inhibitoren. Das erste Molekül I-1 des Inhibitors **5** verdrängt His194 aus seiner gewöhnlichen Position, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den Resten der katalytischen Triade zerstört werden. Der Protonenaustausch, der für die proteolytische Funktion von essenzieller Bedeutung ist, ist nicht mehr möglich.

2 Motivation und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Arbeiten von Dr. Gero Becker (Becker, 2011) und Dr. Kornelia Harges (Harges, 2014) wurden einige Substrate und zahlreiche sehr wirksame substratanaloge Inhibitoren der Proproteinkonvertase Furin bereits entwickelt. Durch gezielte Modifizierungen dieser Leitstrukturen sollten weitere Substrate und Inhibitoren synthetisiert und charakterisiert werden. Die Ziele dieser Arbeit bestanden darin:

- durch *N*-terminale Verlängerung und/oder P3- bzw. P2-Modifizierung des fluorogenen Substrates Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (Verbindung 7) (Becker, 2011) die Effizienz der enzymatischen Furinspaltung zu steigern und somit sensitivere Messungen zu ermöglichen,
- durch *N*-terminalen Einbau weiterer basischer Gruppen in peptidomimetische Inhibitoren die Hemmwirkung des Furin und die proteolytische Stabilität dieser Derivate zu erhöhen,
- durch schrittweise *C*-terminale Verkürzung der Leitstruktur 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba (Verbindung 4) (Harges et al., 2015) die Bedeutung jedes einzelnen Restes für die Bindungsaffinität dieses Derivates zu untersuchen,
- durch *C*-terminale Verlängerung der Sequenz 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg die sogenannte gestrichene Seite des Furin, die sich *C*-terminal von der Substratspaltstelle befindet, zu adressieren und dadurch die Hemmwirkung zu verbessern,
- zyklische Oligoarginin-haltige spezifische Furininhibitoren zu synthetisieren und somit die proteolytische Stabilität der Derivate sowie ihre Zellpermeabilität und folglich auch die Furinhemmung in Zellen zu steigern,
- das toxikologische Profil der Verbindung 4 durch den Austausch des P1-Restes durch weniger stark basische Bausteine oder durch den Ersatz des P2-Arg mit einem Lys-Rest zu optimieren,
- Verbindung 4 und ausgewählte strukturverwandte Derivate, die nach der Synthese als TFA-Salze erhalten wurden, in die entsprechenden Hydrochloride zu überführen und somit die Verbindungen für *in vivo*-Untersuchungen vorzubereiten,
- die *in vivo*-Verträglichkeit dieser Derivate mithilfe von Kooperationspartnern in ersten Tierstudien zu prüfen,
- alle synthetisierten Substrate und Inhibitoren enzymkinetisch zu charakterisieren,
- ausgewählte Inhibitoren Kooperationspartnern für Zellkulturversuche bereitzustellen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der Substrate und Inhibitoren

Anlehnend an die multibasische Furinerkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv -Arg-Xaa-Arg/Lys-Arg↓ wurden zahlreiche neue Substrate und substratanaloge Inhibitoren des Furin dargestellt (Becker, 2011; Becker et al., 2011; Becker et al., 2012; Becker et al., 2010; Harges, 2014; Harges et al., 2015; Harges et al., 2017). Im Falle der Substrate wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Optimierungen vorgenommen, um eine verbesserte Spaltung durch Furin zu erzielen, was Messungen bei reduzierter Enzymkonzentration gestattet. Da die Hemmwirkung des bereits bekannten, jedoch relativ toxischen Inhibitors **4** ($K_i = 5.5 \text{ pM}$) kaum zu steigern war, wurden auch andere Startstrukturen für neue Inhibitoren genutzt.

Die meisten Verbindungen wurden durch eine Kombination aus Festphasen- und Lösungssynthese dargestellt. Der peptidische Teil wurde am Harz nach einem Standard-Fmoc-Protokoll aufgebaut. Dabei wurde sowohl automatisierte als auch manuelle Festphasenpeptidsynthese verwendet. Für die Festphasensynthese wurden Aminosäurederivate, das Kupplungsreagenz HBTU und das Additiv HOBt standardmäßig im 4-fachen sowie DIPEA im 8-fachen Überschuss zur Harzbeladung eingesetzt. Ausnahmen sind an den entsprechenden Stellen erwähnt. Bei der manuellen Synthese wurden Einzelkupplungen, bei der automatisierten Synthese Doppelkupplungen durchgeführt. Zusätzliche Modifikationen der Peptidderivate sowie die Synthesen kleinerer Bausteine und Vorstufen erfolgten in Lösung.

Für sämtliche Synthesen wurden insgesamt drei Harzarten verwendet. 2-Chlortritylchlorid-Harz wurde für die Darstellung der Substrate sowie einiger Inhibitoren mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH oder Fmoc-Lys(Boc)-OH beladen. Dafür wurde 1 eq des Harzes mit einer Lösung aus 1 eq der entsprechenden Aminosäure und 4 eq DIPEA in trockenem DCM versetzt. Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen mit trockenem DCM wurde das Harz dreimal je 1 min mit einer *capping*-Lösung aus DCM, MeOH und DIPEA (17/2/1, v/v/v) behandelt. Danach wurde das Harz jeweils mehrfach mit DCM, DMF und abschließend wieder mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Im Anschluss wurde die neue Harzbeladung mit der Fmoc-geschützten Aminosäure durch zwei verschiedene Methoden bestimmt. Die photometrische Methode basiert auf dem Absorptionsmaximum des Fmoc-Piperidin-Abspaltproduktes (Dibenzofulven-Piperidin-Addukt) bei 301 nm (Eissler et al., 2017). Dafür wurde eine genau eingewogene Harzprobe in einem bestimmten Volumen an einer 20-prozentigen Piperidin-Lösung in DMF suspendiert. Nach 30 min Schütteln bei RT wurde die Suspension filtriert und die Absorption des Filtrates wurde bei 301 nm photometrisch bestimmt. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes konnten die Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes im

Filtrat und dadurch auch die Beladung des Harzes bestimmt werden. Die einfachere gravimetrische Methode beruht auf der Gewichtszunahme des beladenen Harzes, anhand der sich die Beladung relativ einfach ausrechnen lässt. Beide Methoden ergaben sehr ähnliche Werte. Diese wurden bei allen nachfolgenden Syntheseschritten berücksichtigt.

Das etwas säurelabilere Tritylchlorid-Harz wurde für die Synthese mancher Inhibitoren mit einem Amin beladen. Dafür wurden 2 eq des jeweiligen Amins in trockenem DCM gelöst. Die Mischung wurde mit 4 eq DIPEA versetzt. Die klare Lösung wurde zum Harz gegeben und der Vorgang wurde wie zuvor für das 2-Chlortritylchlorid-Harz beschrieben fortgesetzt. Da jedoch die Harzbeladung des Tritylchlorid-Harzes nicht bestimmt wurde, wurde bei der Berechnung der Ansätze der darauffolgenden Syntheseschritte die vom Hersteller angegebene Beladung des Ursprungsharzes eingesetzt.

Die Inhibitoren mit C-terminalem Carbonsäureamid wurden am Fmoc-Rink-Amid-MBHA-Harz hergestellt. Nach Abspaltung des initialen Fmoc-Schutzes wurden die Synthesen direkt nach dem üblichen Fmoc-Protokoll fortgesetzt. Sämtliche Modifizierungen dieser Derivate wurden an der festen Phase durchgeführt und die Produkte nach finaler Abspaltung vom Harz erhalten.

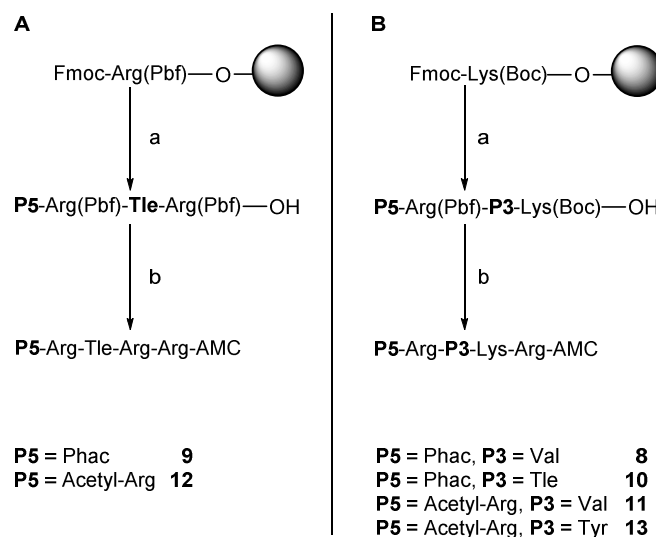
Alle Verbindungen wurden nach beendeter Synthese mittels präparativer HPLC gereinigt, lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten.

3.1.1 AMC-Substrate

Das von Dr. Gero Becker synthetisierte fluorogene Substrat **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) (Becker, 2011) erlaubt relativ sensitive Messungen mit Furin (Hardes et al., 2015). Durch Optimierung dieser Struktur ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die Empfindlichkeit der Messungen zu steigern.

Einige früher publizierte Furinsubstrate besitzen ein Tyr als P3-Rest (Krysan et al., 1999). Aus der Entwicklung substratanaloger Furininhibitoren ist bekannt, dass Tle in P3-Position und zusätzliche basische P5-Reste zu einem deutlichen Affinitätsgewinn führen (Becker et al., 2012; Hardes et al., 2015). Aus diesen Gründen wurden in manchen Substraten Tle oder Tyr in P3-Position eingebaut. Im Rahmen weiterer Synthesen wurde der neutrale P5-Rest des Substrates **7** durch das stark basische Arg ersetzt. Da in physiologischen Substraten sowohl Arg als auch Lys in P2-Position vorkommen, wurde in manchen Derivaten Lys in dieser Position eingebaut.

Die Synthesen und die Strukturen der erhaltenen Verbindungen **8-13** sind in **Schema 1** zusammengefasst.



Schema 1: Synthese der AMC-Substrate des Furin. Die Synthese erfolgte am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz für Derivate mit Arginin (**A**) bzw. Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz für Derivate mit Lysin (**B**) in P2-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll, (ii) 1 % TFA in DCM (v/v), 3 × 30 min, RT; (b) (i) 1.0 eq H-Arg-AMC × 2 HCl, 1.0 eq PyAOP, 3.0 eq DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT, (ii) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 3 h, RT.

Das jeweilige Peptidgrundgerüst der Intermediate wurde am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl- oder Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz durch Festphasenpeptidsynthese aufgebaut. Fmoc-Tle-OH wurde ausgehend von freiem H-Tle-OH durch Umsetzung mit Fmoc-OSu nach einer gewöhnlichen Fmoc-Einführungsmethode dargestellt (Hardes, 2014). Nach Kupplung des *N*-terminalen Phenylacetat- oder Acetat-Restes wurden die Vorstufen unter Erhalt sämtlicher Seitenkettenschutzgruppen mit 1 % TFA in DCM (v/v) unter mild-sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. An den freien *C*-Terminus wurde anschließend H-Arg-AMC × 2 HCl gekuppelt. Dafür wurde jedes Peptidderivat (1 eq) zusammen mit 1 eq H-Arg-AMC × 2 HCl in DMF gelöst und im Eisbad auf 0 °C vorgekühlt. Nach Zugabe von 1 eq des Kupplungsreagenzes PyAOP wurde der pH-Wert durch Zutropfen kleiner Mengen DIPEA (ca. 3 eq) auf 8-9 eingestellt. Die klare grünlich-gelbe Lösung wurde weitere 15 min im Eisbad und danach 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktion wurde der pH-Wert immer wieder kontrolliert und wenn nötig durch Zugabe kleiner Mengen DIPEA auf 8-9 korrigiert. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels HPLC kontrolliert. Das Intermediat wurde mit einer 95-prozentigen TFA-Abspaltung (TFA/TIS/H₂O, v/v/v) versetzt, um die Seitenkettenschutzgruppen zu entfernen. Nach 3 h Stehen bei RT unter gelegentlichem Schütteln wurde das entschützte Peptid in kaltem DEE gefällt.

3.1.2 Zyklische Inhibitoren und deren Referenzverbindungen

Lineare und zyklische Polyarginine sind wirksame Furininhibitoren und besitzen auch zellpenetrierende Eigenschaften (Futaki et al., 2001; Lättig-Tünnemann et al., 2011). Für die in **Abbildung 16** gezeigte zyklische Struktur wurden in der Literatur günstige zellpenetrierende Eigenschaften beschrieben (Qian et al., 2013). Der amphiphile Kern, der für die Zellanlagerung und -penetration zuständig ist, besteht aus einem hydrophilen Tetraarginin- und einem benachbarten hydrophoben Phe-2-Naphthylalanin-Segment. An diese Hexapeptidsequenz wurden die eigentlichen Wirkstoffe kovalent über trifunktionelle Aminosäuren oder Peptidstrukturen gekuppelt und das Peptidrückgrat zyklisiert. Die zyklische amphiphile Sequenz kann somit als *carrier* dienen und die kovalent gebundenen Wirkstoffe zu ihren intrazellulären Zielmolekülen transportieren.

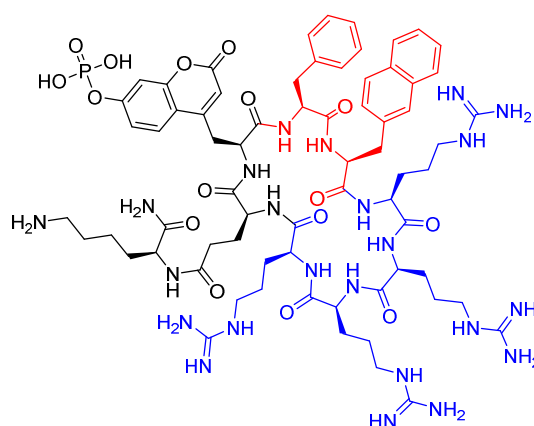
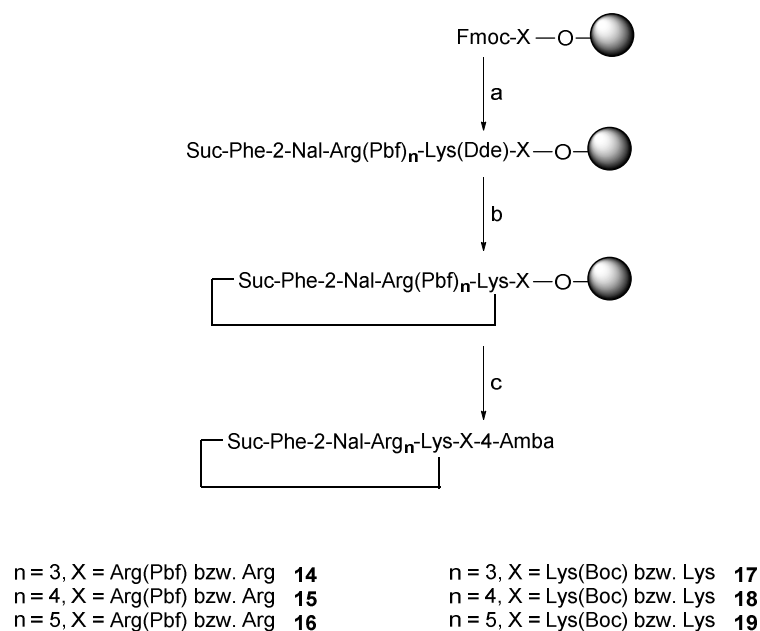


Abbildung 16: Zyklisches amphiphiles Peptid mit zellpenetrierenden Eigenschaften (Qian et al., 2013). Die Kombination aus dem hydrophilen Tetraarginin-Segment (blau) und den benachbarten hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und 2-Naphthylalanin (rot) sorgt für eine ausgeprägte Zellpenetration. Das schwarz dargestellte Segment ist für die Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül zuständig und kann beliebig variiert werden.

Basierend auf dieser Struktur wurden Furininhibitoren hergestellt, deren spezifische Furinerkennungssequenz kovalent mit dem zellpenetrierenden Kern verknüpft ist. Es wurde vermutet, dass das zellpenetrierende Oligoarginin-Segment die Furinhemmung sogar verstärken kann. Da Furin vorwiegend intrazellulär lokalisiert ist, sollen die zellpenetrierenden Eigenschaften die Wirksamkeit der Verbindungen in Zellkulturen und *in vivo* erhöhen. Als Referenzverbindungen wurden zusätzlich einige lineare und zyklische Oligoarginin-Derivate synthetisiert.

3.1.2.1 Synthese der zyklischen Inhibitoren

Die Synthesestrategie und die Strukturen der zyklischen Inhibitoren **14-19** sind in **Schema 2** zusammengefasst.



Schema 2: Synthese der zyklischen Furininhibitoren am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz für die Derivate mit Arginin bzw. Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz für die Derivate mit Lysin in P2-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll, (ii) 4.0 eq Bernsteinsäureanhydrid, 4.0 eq DIPEA, DMF, 2 h, RT; (b) (i) 3 % Hydrazin in DMF (v/v), 3×3 min, RT, (ii) 5.0 eq PyBOP, 5.0 eq 6-Cl-HOBt, 10.0 eq DIPEA, DMF, RT über Nacht; (c) (i) 1 % TFA in DCM (v/v), 3×30 min, RT, (ii) 1.5 eq 4-Amba $\times 2$ HCl, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, 3.0 eq DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT, (iii) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 4.5 h, 40 °C.

Insgesamt wurden sechs zyklische Inhibitoren synthetisiert – die Hälfte davon mit einem Arginin, die andere Hälfte mit einem Lysin in P2-Position. Dementsprechend wurde die Synthese am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl- oder Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz begonnen und nach dem üblichen Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aufgrund ihres hohen Preises wurden die Derivate Fmoc-Lys(Dde)-OH und Fmoc-2-Nal-OH lediglich im 2.5-fachen Überschuss gekuppelt, wodurch jedoch das Erhalten und die Reinheit des gewünschten Produktes nicht merklich beeinträchtigt wurden. Nach Entfernung des finalen *N*-terminalen Fmoc-Schutzes der Hauptkette wurde das Harz (jeweils 1.0 eq) mit jeweils 4.0 eq Bernsteinsäureanhydrid und 4.0 eq DIPEA in DMF für 2 h bei RT succinyliert. Anschließend wurde selektiv die Dde-Schutzgruppe der P3-Lysin-Seitenkette mittels 3-prozentiger Hydrazin-Lösung in DMF abgespalten. Dieses Intermediat wurde zwischen dem *N*-terminalen Succinylrest und der Seitenkette des P3-Lys direkt am Harz zyklisiert (Thakkar

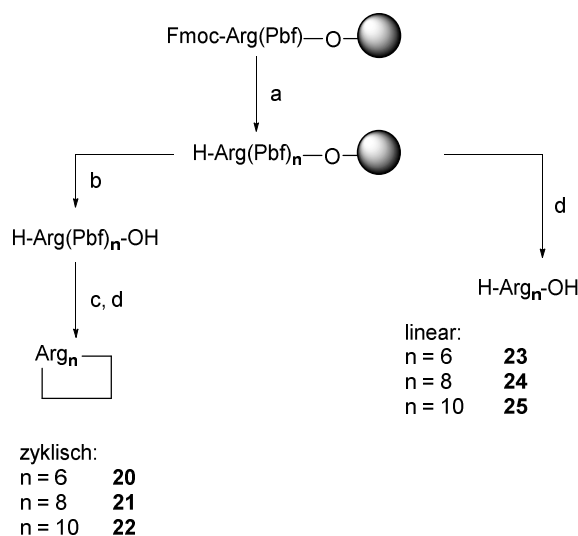
et al., 2013). Im Gegensatz zur Reaktion in Lösung hat eine Zyklisierung am Harz den Vorteil, dass sie weitestgehend intramolekular abläuft und es kaum zu intermolekularen Nebenreaktionen kommt, demzufolge entstehen keine Dimere oder Trimere. Zur Zyklisierung wurde das Harz mit einer Lösung aus 5.0 eq des Kupplungsreagenzes PyBOP, 5.0 eq des Additivs 6-Cl-HOBt und 10.0 eq der Hilfsbase DIPEA in DMF versetzt und bei RT über Nacht geschüttelt. Danach wurden die Zwischenstufen durch Behandlung mit 1 % TFA/DCM (v/v) unter Erhalt restlicher Schutzgruppen mild-sauer vom Harz abgespalten. An den freien C-Terminus dieses Intermediates wurde anschließend 4-Amba \times 2 HCl gekuppelt. Hierfür wurde die jeweilige geschützte Vorstufe (jeweils 1 eq) zusammen mit jeweils 1.5 eq 4-Amba \times 2 HCl in DMF suspendiert und im Eisbad auf 0 °C vorgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 1.65 eq des Kupplungsreagenzes PyBOP und 4.5 eq des Additivs 6-Cl-HOBt hinzugefügt. Das verwendete Additiv 6-Cl-HOBt besitzt im Vergleich zum Standardadditiv HOBt einen reduzierten pK_a -Wert (HOBt: $pK_a = 4.30$, 6-Cl-HOBt: $pK_a = 3.35$) und bildet einen reaktiveren Aktivester mit einer besseren Abgangsgruppe. Dadurch wird die Kupplungsreaktion beschleunigt und die Razemisierung der Carboxylkomponente bei dieser Segmentkondensation verringert (Joullié and Lassen, 2010). Durch anschließende Zugabe der Hilfsbase DIPEA (ca. 3 eq, resultierender pH-Wert 8-9) wurde die Reaktion gestartet. HPLC-Kontrollen nach 4 h zeigten bei allen Ansätzen einen vollständigen Umsatz. Das Intermediat wurde mit 95 % TFA für 4.5 h bei 40 °C behandelt. Die verlängerte Reaktionszeit sowie die höhere Temperatur waren aufgrund der mehrfach vorhandenen relativ stabilen Pbf-Schutzgruppen notwendig. Die Peptide wurden anschließend in vorgekühltem DEE gefällt.

3.1.2.2 Zyklische und lineare Referenzverbindungen

Die Synthesestrategie und die Sequenzen der Verbindungen **20-25** sind in **Schema 3** dargestellt.

Die zyklischen und linearen Oligoarginine wurden am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz nach einem Standard-Fmoc-Protokoll aufgebaut. Für die Synthese der zyklischen Derivate wurden nach Abspaltung des letzten *N*-terminalen Fmoc-Schutzes $\frac{3}{4}$ des jeweiligen Harzes mit 1 % TFA in DCM behandelt. Dadurch wurden die Oligoarginin-Derivate unter Erhalt der Schutzgruppen in den Seitenketten von der festen Phase freigesetzt. Der Rest des Harzes wurde für die Synthese der linearen Referenzverbindungen verwendet, dazu wurde dieser unter stark sauren Bedingungen für 5 h bei RT vollständig abgespalten. Im Gegensatz dazu wurden die mild abgespaltenen Peptide zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe und der *N*-terminalen Aminogruppe in Lösung zyklisiert (Thakkar et al., 2013). Hierfür wurden die linearen Vorstufen in DMF gelöst und auf eine Konzentration von etwa 1.25 mmol/L verdünnt (Dechantsreiter et al., 1999). Die starke Verdünnung soll unerwünschte intermolekulare Nebenreaktionen minimieren. Anschließend

wurden jeweils 5.0 eq DIPEA zugesetzt und zu jedem Ansatz jeweils eine Lösung aus 2.0 eq PyBOP und 2.0 eq 6-Cl-HOBt in DMF innerhalb von 40 min bei RT langsam zugetropft. Währenddessen und auch während der gesamten Reaktionszeit wurde der pH-Wert in regelmäßigen Abständen kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe kleiner Mengen DIPEA auf einen Wert von 7-8 gebracht. Nach 48 h war der Edukt-Peak im HPLC-Chromatogramm nicht mehr sichtbar. Der Ansatz wurde auf 2-3 mL eingengt und in H₂O gefällt. Das erhaltene Präzipitat wurde mit H₂O gewaschen und mit 95 % TFA für 4.5 h bei 40 °C behandelt – wiederum aufgrund der mehrfach vorhandenen Pbf-Schutzgruppen. Bei der Abspaltung der Pbf-Schutzgruppen stören auch Reste von DMF, obwohl es durch das Ausfällen mit Wasser weitestgehend abgetrennt werden konnte. Bei der stark sauren Abspaltung löste sich das jeweilige Präzipitat nicht sofort in der TFA-Lösung auf, sondern erst nach 15 bis 30 min. Die Peptide wurden anschließend in vorgekühltem DEE gefällt. Allerdings waren in den anschließenden HPLC-Kontrollen hauptsächlich Peaks Pbf-geschützter Produkte zu sehen, vor allem in den Chromatogrammen des Octa- und Decaarginins. Aus diesem Grund wurde die saure Pbf-Abspaltung bei 40 °C wiederholt (5 h für das Hexaarginin und 7 h für die längeren Peptide). Dadurch konnten alle Derivate vollständig von den Schutzgruppen befreit werden.



Schema 3: Synthese der zyklischen und linearen Referenzverbindungen am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz. Reagenzien und Bedingungen: (a) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll, (b) 1 % TFA in DCM (v/v), 3×30 min, RT, (c) 2.0 eq PyBOP, 2.0 eq 6-Cl-HOBt, 5.0 eq DIPEA (pH ~ 7-8), DMF, 48 h, RT, (d) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v): 5 h bei RT für die linearen Verbindungen, 4.5 h und anschließend weitere 5 bis 7 h bei 40 °C für die zyklischen Derivate.

3.1.3 C-terminal verlängerte Peptidderivate

Durch C-terminale Verlängerung der nur aus dem P5-P1-Segment bestehenden Inhibitoren ist es prinzipiell möglich, die Selektivität der Hemmstoffe für einzelne PCs zu verbessern. Es ist bekannt, dass nur geringe strukturelle Unterschiede zwischen den Bindetaschen für die Reste *N*-terminal der Spaltstelle existieren, während sich die Taschen im gestrichenen Bereich der verschiedenen PCs deutlicher unterscheiden (Henrich et al., 2005). Eine direkte C-terminale Verlängerung der Hemmstoffe ist mit einem decarboxylierten P1-Argininmimetikum in P1-Position jedoch nicht auf einfache Weise möglich. Aus diesem Grund wurde der P1-Amba-Baustein durch andere Reste oder *linker* ersetzt, die eine C-terminale Verlängerung gestatten. Es wurde untersucht, ob durch die Adressierung der gestrichenen Furinseite eine ausreichende Furinhemmung erreicht werden kann, die den P1-Amba-Verlust kompensiert.

Die Peptidsequenzen aller C-terminal verlängerten Derivate (**26-42**) sind in **Tabelle 6** auf S. 68 dargestellt. Die Synthese wurde am Fmoc-Rink-Amid-MBHA-Harz nach einem Standard-Fmoc-Protokoll durchgeführt. Rink-Amid-Harze gestatten die direkte Synthese von Peptiden, die nach Harzabspaltung als Carbonsäureamide erhalten werden. Im Unterschied zu Carbonsäuren besitzen Amide keine zusätzliche negative Ladung am C-Terminus, was für die Bindung an das stark negativ geladene aktive Zentrum des Furin von Vorteil sein sollte.

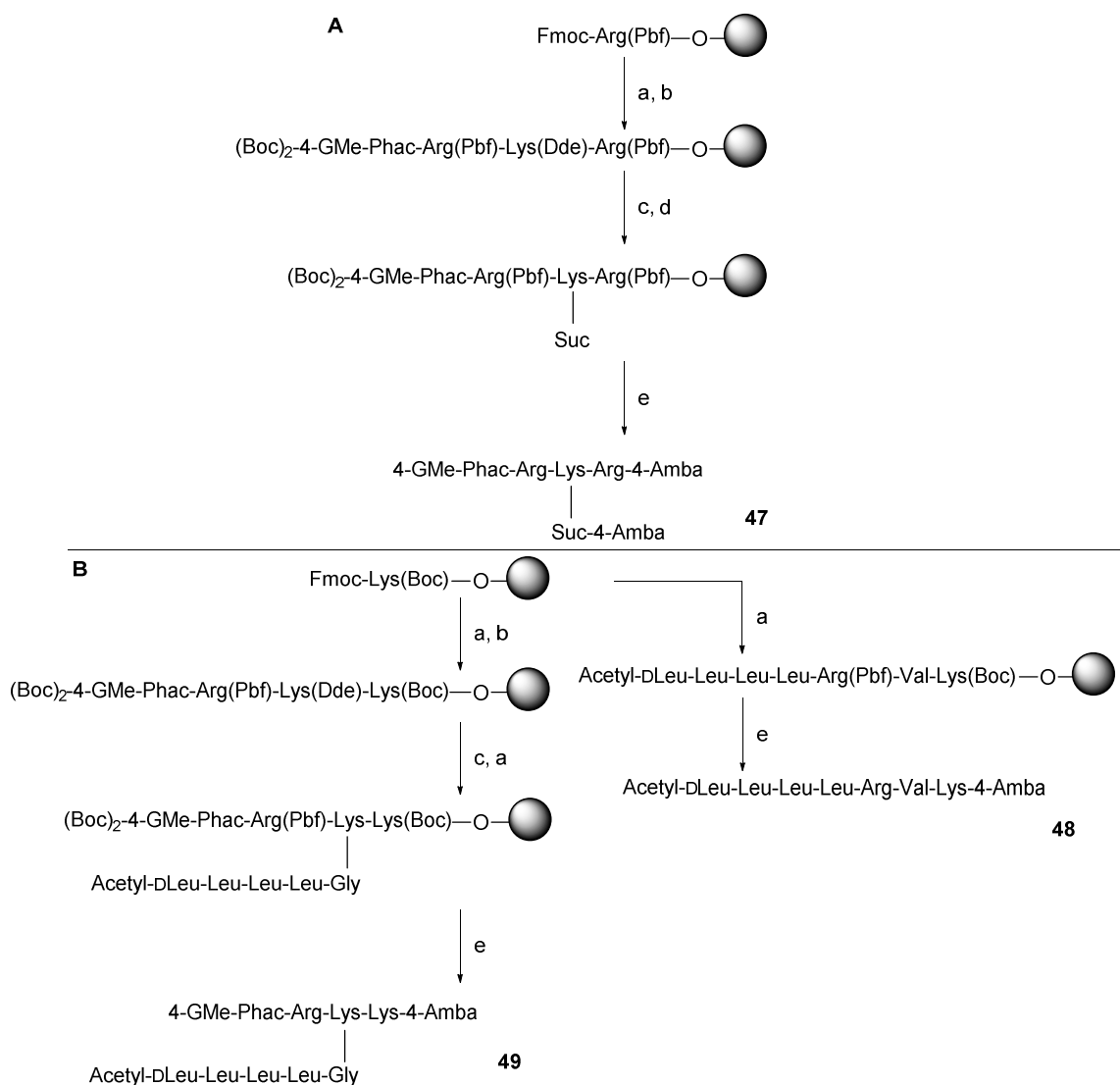
Die speziellen Aminosäurederivate Fmoc-4-AMe-Phac-OH, Fmoc-3-AMe-Phac-OH und Boc-Orn(Fmoc)-OH wurden nur mit 2.5-fachen Überschuss gekuppelt. Fmoc-5-Ava-OH wurde ausgehend von freier 5-Ava-OH durch Umsetzung mit Fmoc-OSu gemäß einer gewöhnlichen Fmoc-Einführungsmethode dargestellt. Nach Abspaltung des finalen *N*-terminalen Fmoc-Schutzes wurde die jeweilige freie Aminogruppe der Verbindungen **28-31** und **36-42** in ein Guanidin überführt. Hierfür wurde das jeweilige harzgebundene Peptidderivat mit 3.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (Bernatowicz et al., 1993) und 4.0 eq DIPEA in DMF bei RT über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Peptide durch Behandlung mit 95 % TFA für 3 h bei RT vom Harz freigesetzt und gleichzeitig von sämtlichen Schutzgruppen befreit. Die Inhibitoren **26** und **27** wurden nach der Kupplung des *N*-terminalen Phenylacetat-Restes und die Derivate **32-35** mit dem 4-AMe-Phac-Rest in P5-Position nach der Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 95 % TFA direkt vom Harz vollständig abgespalten. Alle entschützten Verbindungen wurden in kaltem DEE gefällt.

Als Referenzverbindungen für die Stabilitätsuntersuchungen wurden auch zwei kürzere Amidderivate (**43** und **45**) und deren entsprechenden Carbonsäureanaloga (**44** und **46**) hergestellt, die die gestrichene Seite nicht adressieren, sondern mit dem P1-Rest am C-Terminus enden. Die

Carbonsäurederivate wurden analog der Amidderivate hergestellt, allerdings ausgehend von Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl- oder Fmoc-Gly-2-Chlortrityl-Harz.

3.1.4 Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette

Die Synthese und die Strukturen der Inhibitoren **47-49** sind in **Schema 4** zusammengefasst.



Schema 4: Synthese der Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz für das Derivat mit Arginin (**A**) bzw. Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz für die Derivate mit Lysin (**B**) in P2-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll; (b) 3.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 4.0 eq DIPEA, DMF, RT über Nacht; (c) 3 % Hydrazin in DMF (v/v), 3 × 3 min, RT; (d) 4.0 eq Bernsteinsäureanhydrid, 4.0 eq DIPEA, DMF, 2 h, RT; (e) (i) 1 % TFA in DCM (v/v), 3 × 30 min, RT, (ii) 1.5 eq 4-Amba × 2 HCl, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, 3.0 eq DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT (für Verbindung **47** in (**A**) doppelte Mengen an Reagenzien), (iii) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 3 h, RT.

Aus den Kristallstrukturen des Furin im Komplex mit substratanalogen Inhibitoren wird ersichtlich, dass die Seitenkette des P3-Restes ins Lösungsmittel gerichtet ist, jedoch auch relativ nah an die Seitenkette des Glu257 kommt. Daher wurde vermutet, dass längere basische Substituenten günstigere Interaktionen zur Seitenkette des Glu257 ausbilden und somit zu einer verbesserten Bindungsaffinität beitragen könnten (Henrich et al., 2003). Daher wurde versucht, die Wirksamkeit des Inhibitors **4** durch den Einbau eines zweiten 4-Amba-Restes in P3-Position weiterhin zu verbessern (Verbindung **47**).

Des Weiteren wurde ein bekannter PACE4- und Furininhibitor mit einer relativ guten Verträglichkeit *in vivo* (Kwiatkowska et al., 2016) als Referenzverbindung für künftige Toxizitätsuntersuchungen dargestellt (Verbindung **48**). Die *N*-terminale Sequenz dieses Derivates wurde in die P3-Seitenkette einer weiteren Referenzverbindung eingebaut (Verbindung **49**).

Die Synthese dieser drei Inhibitoren wurde wiederum nach dem bekannten Fmoc-Protokoll begonnen. Für den Inhibitor **47** wurde das Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz verwendet, die anderen zwei Verbindungen wurden am Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz aufgebaut. Die ungewöhnlichen Derivate Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-DLeu-OH und Fmoc-4-AMe-Phac-OH wurden lediglich im 2.5-fachen Überschuss gekuppelt, wodurch jedoch das Erhalten und die Reinheit des gewünschten Produktes nicht merklich beeinträchtigt wurde. Durch Acetylierung des *N*-terminalen D-Leucins wurde die Festphasensynthese für den Inhibitor **48** beendet, der im letzten Schritt nur noch abgespalten werden musste.

Die Intermediate der Inhibitoren **47** und **49** wurden weiter am Harz modifiziert. Zunächst wurde die Fmoc-entschützte *N*-terminale Aminogruppe der Hauptkette in ein Guanidin überführt (**Kapitel 3.1.3**). Danach wurden beide Peptidderivate an der P3-Lys-Seitenkette weiter verlängert. Dafür wurde zuerst der Dde-Schutz des Lysins wie in **Kapitel 3.1.2.1** beschrieben entfernt. Als Nächstes wurde das Intermediat des Inhibitors **47** mit jeweils 4.0 eq Bernsteinsäureanhydrid und 4.0 eq DIPEA in DMF für 2 h bei RT an der P3-Seitenkette succinyliert. Die Verlängerung der P3-Seitenkette des Intermediates zur Synthese des Inhibitors **49** erfolgte nach dem üblichen Fmoc-Protokoll.

Alle drei Derivate wurden im Anschluss an die Festphasensynthese unter mild-sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. Die darauffolgende 4-Amba-Kupplung erfolgte wie bereits in **Kapitel 3.1.2.1** beschrieben. Zur Synthese des Inhibitors **47** wurde die doppelte Menge an Reagenzien verwendet, da diese Zwischenstufe zwei freie Carboxylgruppen besaß (das *C*-terminale P2-Arginin in der Hauptkette und der Succinylrest an der P3-Seitenkette). Nach vollständigem Umsatz wurden die Peptide mit 95 % TFA für 3 h behandelt und dadurch endgültig von allen restlichen Schutzgruppen befreit. Dieser Vorgang musste für die Verbindungen **48** und **49**

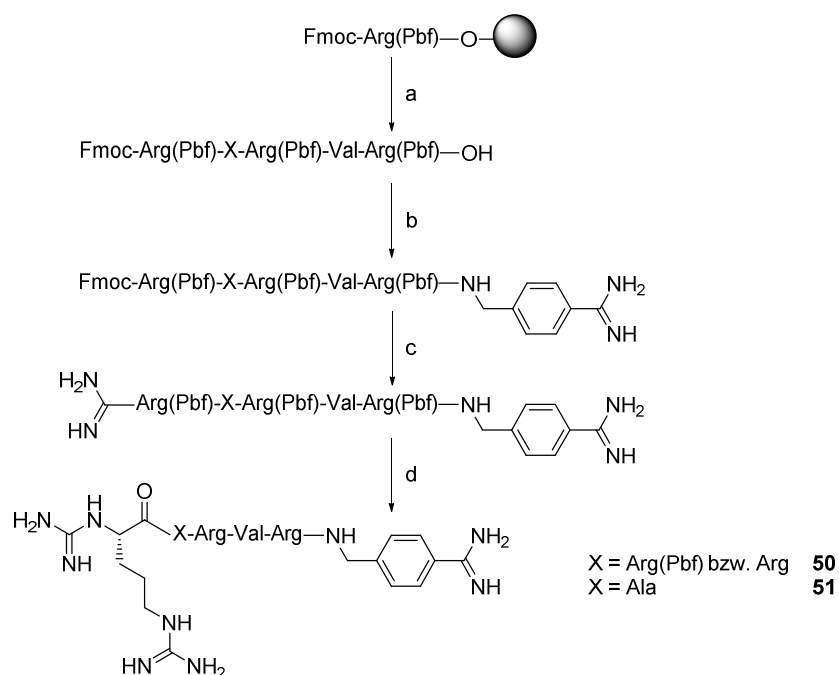
wiederholt werden, da nach der ersten Behandlung mit TFA keine vollständige Pbf-Abspaltung erzielt werden konnte (HPLC-Kontrolle). Die Verbindung **48** neigte dazu, gelartige wässrige Lösungen zu bilden, die – trotz relativ starker Verdünnung – in kürzester Zeit fest wurden. Dies erschwerte die finale Reinigung dieser Verbindung, da nur sehr stark verdünnte Lösungen in die präparative HPLC-Anlage injiziert werden konnten. Dementsprechend mussten mehrere HPLC-Trennungen hintereinander durchgeführt werden. Diese Eigenschaft des Inhibitors **48** liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der spezifischen hydrophoben Poly-Leu-Sequenz. Trotz des Vorhandenseins der gleichen Sequenz in der P3-Verzweigung weist die Verbindung **49** diese Problematik nicht auf. Der Grund dafür ist offenbar das Vorkommen weiterer polarer Gruppen in der Hauptkette, die die Hydrophobizität aufheben und die Gelbildung verhindern.

3.1.5 Derivate mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe

Furin hat eine starke Präferenz für multibasische Substrate, die zusätzliche basische Aminosäuren *N*-terminal des P4-Restes besitzen, häufig in P6-Position, aber auch an anderen Stellen (Hardes et al., 2017). Daher sollte ausprobiert werden, ob durch Umwandlung einer *N*-terminalen α -Aminogruppe in ein Guanidin eine Affinitätssteigerung prinzipiell möglich ist, da ein Guanidin stärker basisch ist und in vielen Fällen mehr polare Wechselwirkungen ausbilden kann.

Eine Zusammenfassung der Synthesestrategie und der Strukturen der Verbindungen **50** und **51** befindet sich in **Schema 5**. Die Synthese beider Derivate wurde am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz gemäß dem üblichen Standard-Fmoc-Protokoll begonnen. Nach Kupplung des letzten Arginin-Restes wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe nicht entfernt. Die Intermediate wurden durch Behandlung mit 1 % TFA in DCM unter Erhalt sämtlicher Schutzgruppen mild vom Harz abgespalten. An den freien *C*-Terminus wurde 4-Amba wie in **Kapitel 3.1.2.1** beschrieben gekuppelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die öligen Rückstände mit einer 10-prozentigen Diethylamin- (DEA)-Lösung in DMF versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde die vollständige Abspaltung des Fmoc-Schutzes mittels HPLC-Kontrolle verifiziert. Die Ansätze wurden *in vacuo* eingengt. Die Umwandlung der freien Amine in die entsprechenden Guanidine wurde wiederum in DMF vorgenommen. Hierfür wurden initial 5.0 eq 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin×HCl (Bernatowicz et al., 1992) zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von DIPEA auf ~9-10 eingestellt. Das Reagenz löste sich dabei komplett auf. Während der gesamten Reaktionszeit wurde der pH-Wert durch gelegentliches Zutropfen kleiner Mengen DIPEA konstant gehalten. Da nach 4 h die HPLC-Kontrolle einen nicht ausreichenden Umsatz zeigte, wurden weitere 5.0 eq des 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin×HCl zugegeben. Dies führte zu einem deutlichen, aber noch nicht zufriedenstellenden Umsatz innerhalb von etwa 24 h, weswegen erneut 5.0 eq des Reagenzes

hinzugefügt wurden. Nach weiteren 24 h wurde für beide Derivate ein Umsatz von etwa 80-90 % erreicht. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit konzentrierter TFA abgebrochen und das Lösungsmittel abgedampft. Die Zwischenstufen wurden mit 95 % TFA für 3 h bei RT behandelt. Die Peptide wurden anschließend in vorgekühltem DEE gefällt. Da die anschließende HPLC-Kontrolle das Vorhandensein restlicher Pbf-Schutzgruppen anzeigte, wurde deren Abspaltung mit TFA wiederholt. Damit wurden die Peptide endgültig von den Schutzgruppen befreit.



Schema 5: Synthese der Inhibitoren mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz. Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll unter Erhalt der finalen *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach dem letzten Kupplungsschritt, (ii) 1 % TFA in DCM (v/v), 3 \times 30 min, RT; (b) 1.5 eq 4-Amba \times 2 HCl, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, 3.0 eq DIPEA (pH \sim 9), DMF, 15 min bei 0 $^{\circ}$ C, 4 h bei RT; (c) (i) 10 % DEA in DMF (v/v), 1 h, RT, (ii) 15 eq 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin \times HCl (schrittweise Zugabe), DIPEA (pH \sim 9-10), 72 h, RT; (d) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 2 \times 3 h, RT.

3.1.6 C-terminal verkürzte Peptidderivate

Die Verbindung **4** ist der bisher stärkste Furininhibitor weltweit, bedarf jedoch aufgrund seines eingeschränkten toxikologischen Profils weiterer Optimierungen (**Kapitel 3.5**). Um die Bedeutung der einzelnen Reste dieser Verbindung für die Hemmwirkung genauer zu untersuchen, wurden C-terminal verkürzte Analoga als C-terminale Amide (Verbindungen **52-54**) synthetisiert (**Tabelle 9**, S. 74), indem die C-terminalen Reste der Leitstruktur **4** schrittweise eliminiert wurden. Es wurden das P5-P4-Segment **52** (4-GMe-Phac-Arg-NH₂), die P5-P3-Verbindung **53** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-NH₂) und das P5-P2-Peptidderivat **54** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH₂)

dargestellt. Die Synthese wurde am Fmoc-Rink-Amid-MBHA-Harz wie zuvor für die C-terminal verlängerten Derivate (**Kapitel 3.1.3**) beschrieben durchgeführt. Fmoc-4-AMe-Phac-OH wurde nur im 2.5- anstatt im 4-fachen Überschuss gekuppelt.

Die Verbindung **55** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-OH) mit freier Carbonsäure am C-Terminus wurde als Referenzverbindung zum analogen Amid **54** am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz hergestellt.

3.1.7 Modifizierung der P1-Position

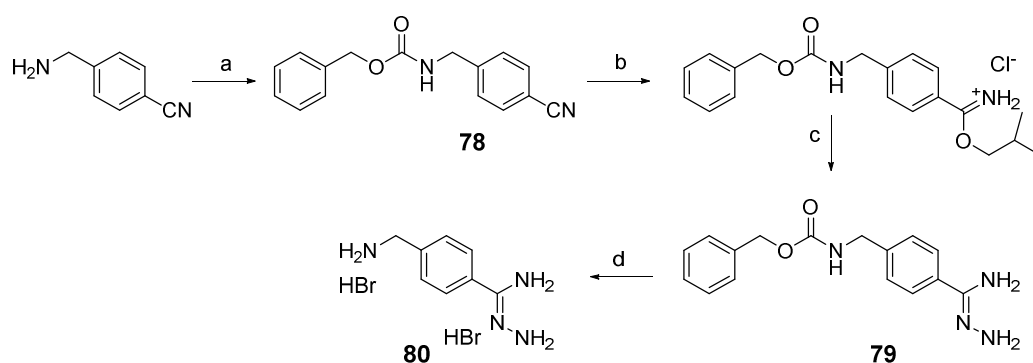
Wie bereits erwähnt, ist der P1-4-Amba-Rest möglicherweise für die toxischen Wirkungen der Verbindung **4** *in vivo* verantwortlich (siehe auch **Kapitel 3.5**). Ein Grund für die Toxizität könnte die starke Basizität des Benzamidins sein. Aus diesem Grund wurde dieser P1-Baustein hauptsächlich durch weniger stark basische Reste mit reduzierten pK_a -Werten ersetzt. Aber auch das Maskieren des Benzamidins als Hydroxyamidin-*prodrug* könnte unter Umständen eine Verbesserung der Verträglichkeit bewirken. Durch die verzögerte Umwandlung des *prodrug* in den eigentlichen Amidin-Wirkstoff werden Konzentrationsspitzen vermieden, die bei einer *i.v.*- oder *i.p.*-Darreichung deutlich ausgeprägter sind.

Alle Derivate mit modifiziertem P1-Rest (**56-77**) wurden nach dem folgenden Muster erhalten: Das P5-P2-Segment wurde an der festen Phase aufgebaut, während der P1-Baustein in Lösung hergestellt wurde. Dieser wurde entweder direkt an das vorgefertigte Peptid in Lösung gekuppelt oder zuerst am Harz immobilisiert. Im letzteren Fall wurden anschließend die Reste des P5-P2-Segments sukzessive angekuppelt. Die Synthesen einiger P1-Bausteine (**80**, **85**, **87**, **92** und **94**) erforderten etwas mehr Aufwand und sind in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben. Die Darstellung der restlichen niedermolekularen Bausteine (**98-102**) ist bei der Synthese der entsprechenden Inhibitoren erklärt.

3.1.7.1 Synthese des Amidrazon-Bausteins **80**

Die Synthese ist in **Schema 6** dargestellt. Die Aminogruppe des Eduktes 4-(Aminomethyl)benzonitril wurde zunächst nach einer Standardprozedur mithilfe von Cbz-OSu geschützt (Derivat **78**). Das Nitril wurde dann durch eine Pinner-Reaktion mit Isobutanol und Salzsäure zum Hydrochlorid des entsprechenden Imidoesters umgesetzt (DeWolfe and Augustine, 1965). Hierbei wurde festgestellt, dass das Produkt im Vergleich zum Nitril (Derivat **78**) viel stärker bei 254 als bei 220 nm absorbiert. Dies erschwerte die Bewertung des Reaktionsfortschritts mittels HPLC, der sonst standardmäßig bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm geprüft wurde. Die

Bildung des Imidoesters erfolgte sehr langsam; nach zehn Tagen Reaktionszeit wurde lediglich ein etwa 25-prozentiger Umsatz (Kontrolle bei 220 nm) erreicht. Anschließend wurde das Pinner-Salz ohne Reinigung mit einem Überschuss an Hydrazin behandelt (Kim et al., 2006); nach 2 h Reaktionszeit war das Edukt vollständig zum Derivat **79** umgesetzt. Abschließend wurde der Cbz-Schutz mittels 32 % HBr in Eisessig entfernt und der finale Baustein (**80**) als zweifaches Hydrobromid-Salz erhalten.



Schema 6: Synthese des Amidrazon-Bausteins **80**, ausgehend von 4-(Aminomethyl)benzonitril \times HCl. Reagenzien und Bedingungen: (a) DIPEA (pH \sim 8-9), 0.9 eq Cbz-OSu, MeCN/H₂O, 1.5 h bei 0 °C, 2 h bei RT; (b) 4 mol/L HCl in Dioxan, Dioxan/Isobutanol (1/1, v/v), 1 h bei 0 °C, 10 d bei 5 °C; (c) Hydrazinhydrat im Überschuss, MeCN/H₂O (4/1, v/v), 2 h, RT; (d) 32 % HBr in Eisessig, 1 h, RT.

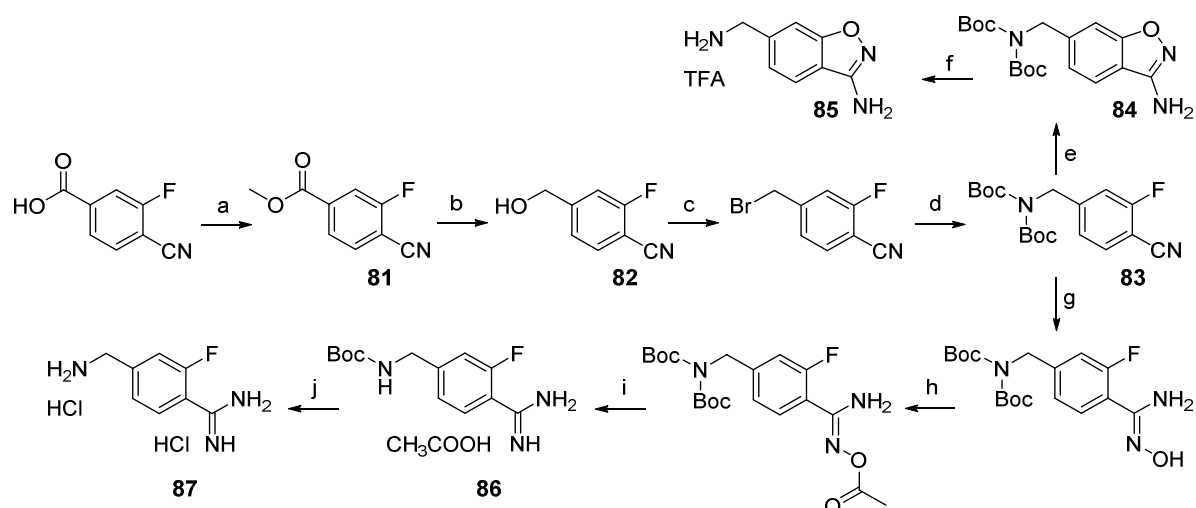
3.1.7.2 Synthese der Verbindungen **85** und **87**

Die Synthese ist in **Schema 7** dargestellt. Die kommerziell erhältliche 4-Cyano-3-fluorbenzoesäure wurde zunächst mittels Dimethylsulfat in den Methylester (**81**) überführt. Nach Reduktion mit NaBH₄ wurde das Hydroxymethyl-Derivat (**82**) erhalten (Huang et al., 2008), das anschließend in das analoge Bromid überführt wurde (Khazdooz et al., 2016). Im Laufe der Reaktion entstehendes Wasser wurde durch das zugesetzte Phosphorpentoxid dem Ansatz entzogen. Das instabile Bromsubstituierte Intermediat wurde ohne Reinigung mit Di-*tert*-butyliminodicarboxylat in Gegenwart von NaH zu dem entsprechenden Bis-Boc-geschützten Amin (**83**) umgesetzt (Kim et al., 2007).

Das Derivat **83** wurde anschließend in ein Benzisoxazol (**84**) überführt (Quan et al., 2005). Dafür wurde zunächst Acetohydroxamsäure mit Kalium-*tert*-butanolat in DMF versetzt und diese Mischung 40 min bei RT gerührt. Zu der entstandenen dickflüssigen Suspension wurde der 4-Cyano-3-fluor-substituierte Aromat **83** zugegeben. Im HPLC-Chromatogramm nach etwa 8 h waren zwei neue Peaks zu sehen. Im Laufe der Zeit wurde der Peak mit kürzerer Retentionszeit, der nicht eindeutig identifiziert werden konnte, immer kleiner, während der Peak des hydrophoberen Produktes, welches durch Massenspektrometrie dem gewünschten zyklischen Reaktionsprodukt **84** zugeordnet wurde, immer größer wurde. Nach 48 h wurde ein nahezu

kompletter Umsatz erreicht. Vermutlich handelt es sich bei der hydrophileren Verbindung um die intermediär auftretende und noch nicht zyklisierte Zwischenstufe. Zum Schluss wurde der Boc-Schutz durch Behandlung mit 95 % TFA entfernt und der finale Baustein **85** als TFA-Salz erhalten.

Ausgehend vom Baustein **83** wurde auch das Derivat **87** erhalten. Dies erfolgte analog der bekannten Synthese von 4-Amba (Becker et al., 2010). Nach Umsetzung des Nitrils (**83**) mit Hydroxylamin wurde das erhaltene Hydroxyamidin mithilfe von Essigsäureanhydrid acetyliert (Judkins et al., 1996). Die darauffolgende Hydrierung lieferte das entsprechende Amidin (**86**). Überraschenderweise wurde während der Hydrierung in Essigsäure eine Boc-Schutzgruppe abgespalten und daher nur das einfach Boc-geschützte Amidin-Intermediat **86** als Hauptprodukt erhalten. Zum Schluss wurde auch die zweite Boc-Schutzgruppe mithilfe von HCl in Eisessig entfernt und der finale Baustein (**87**) als zweifaches Hydrochlorid-Salz erhalten.



Schema 7: Synthese einiger niedermolekularer Bausteine, ausgehend von 4-Cyano-3-fluorbenzoesäure. Reagenzien und Bedingungen: (a) 1.8 eq K_2CO_3 , 1.5 eq Dimethylsulfat, Aceton, Rückfluss, 2 h; (b) 6.0 eq $NaBH_4$, MeOH, 3 d, RT; (c) 2.0 eq KBr, 3.0 eq P_2O_5 , MeCN, 1 h, RT; (d) 2.0 eq Di-*tert*-butyliminodicarboxylat, 2.0 eq NaH, trockenes THF, 1 h bei 0 °C, über Nacht bei RT; (e) 3.0 eq Kalium-*tert*-butanolat, 3.0 eq Acetohydroxamsäure, DMF, 48 h, RT; (f) TFA/TIS/ H_2O (95/2.5/2.5, v/v/v), 1.5 h, RT; (g) 1.5 eq Hydroxylamin \times HCl, 1.5 eq DIPEA, EtOH, Rückfluss, 6 h; (h) 3.0 eq Acetanhydrid, Eisessig, 30 min, RT; (i) 10 % Pd/C, H_2 , 90 % CH_3COOH/H_2O (v/v), 72 h, RT (bei der langen Reaktionszeit im Säuren wird die eine Boc-Schutzgruppe beihnahe quantitativ abgespalten); (j) 1 mol/L HCl in Eisessig, 2 h, RT.

3.1.7.3 Synthese der Verbindungen 92-95 und 97

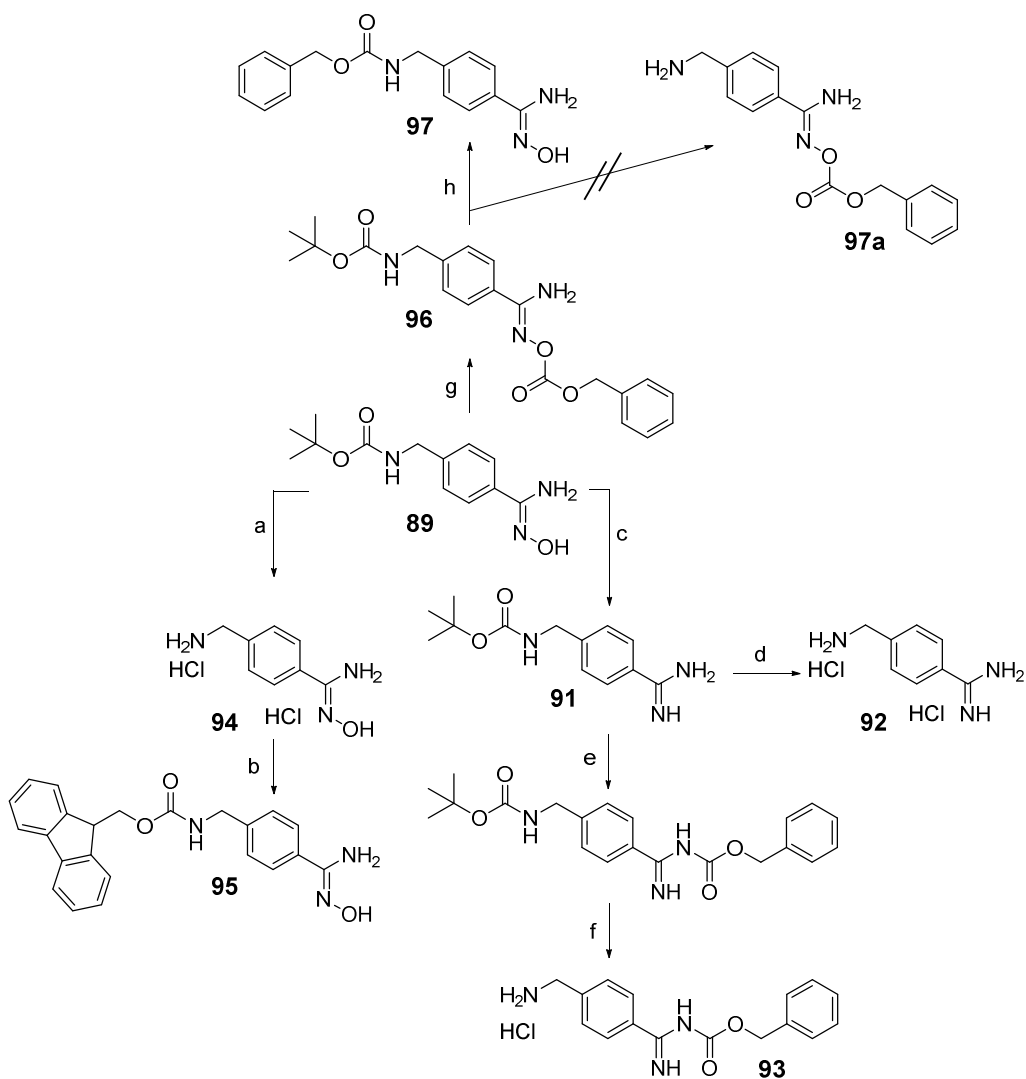
Die Synthese ist in **Schema 8** dargestellt. Aus der Vorstufe **89** (Schweinitz et al., 2006) wurde 4-Amba (**92**) anhand der bekannten Methode (Becker et al., 2010) als zweifaches Hydrochlorid-Salz erhalten. Durch Umsetzung des Intermediats **91** mit Cbz-Cl wurde die aromatische

Amidinogruppe ins Cbz-Derivat überführt. Aufgrund des relativ hohen pK_a -Wertes des Benzamidins (etwa 11, siehe **Kapitel 3.2.2.6**) wurde hierfür das reaktivere Cbz-Cl anstatt des bei aliphatischen Aminen standardmäßig verwendeten Cbz-OSu eingesetzt. Nach Behandlung mit HCl in Ethylacetat wurde die Verbindung **93** als Hydrochlorid erhalten.

Das Derivat **94** wurde als zweifaches Hydrochlorid-Salz nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe des Intermediats **89** erhalten. Die freie aliphatische Aminogruppe wurde anschließend mittels Fmoc-OSu ins Fmoc-Derivat **95** überführt. Unter den genutzten Bedingungen erfolgte keinerlei Acylierung am Hydroxyamidin des Intermediates **94**, was mittels NMR-Analytik bestätigt wurde (Anhang, S. XXIX-XXX).

In das Hydroxyamidin der Zwischenstufe **89** wurde durch Umsetzung mit Cbz-OSu ein Cbz-Schutz eingeführt (Derivat **96**). In diesem Falle war die Reaktivität des eingesetzten Reagenzes ausreichend (der pK_a -Wert des Hydroxyamidins ist mit 5.01 deutlich niedriger als der pK_a -Wert des Amidins), sodass man auf die Anwendung von Cbz-Cl verzichten konnte. Das ^1H -NMR-Spektrum des Produkts **96** deutet darauf hin, dass die Cbz-Gruppe an die Hydroxyl- und nicht an die Amino-Funktion des Hydroxyamidins angekuppelt wurde (Anhang, S. XXXI). Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe sollte im letzten Schritt das gewünschte Produkt **97a** mit freier aliphatischer Aminogruppe und Cbz-geschütztem Hydroxyamidin erhalten werden. Überraschenderweise wurde jedoch eine Wanderung der Cbz-Gruppe vom Hydroxyamidin zum *in situ* entschützten aliphatischen Amin festgestellt, sodass letztendlich Verbindung **97** als einziges Reaktionsprodukt isoliert und charakterisiert wurde. Die Wanderung der Cbz-Schutzgruppe wurde mittels NMR-Analytik eindeutig bestätigt (Anhang, S. XXXII-XXXIII). Dagegen lässt sich das analoge Cbz-geschützte Amidin-Derivat **93** durch den analogen Syntheseweg problemlos darstellen, d.h., die Cbz-geschützte Amidinogruppe bleibt bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe intakt (Anhang, S. XXVII). Vermutlich ist der Carbonyl-Kohlenstoff der Cbz-Gruppe des Derivates **93** nicht elektrophil genug, um einen nukleophilen Angriff durch die Benzylaminogruppe zuzulassen. Der analoge Kohlenstoff in der Verbindung **97a** mit freier aliphatischer Aminogruppe und Cbz-geschütztem Hydroxyamidin ist dagegen wahrscheinlich elektrophiler, sodass ein nukleophiler Angriff mit einhergehender Umlagerung der Cbz-Gruppe an das aliphatische Amin begünstigt wird.

Die Verbindungen **93**, **95** und **97** wurden zwar bei den Synthesen der finalen Inhibitoren nicht eingesetzt, sie sind jedoch hilfreiche Referenzverbindungen für die NMR-Charakterisierung anderer Derivate.

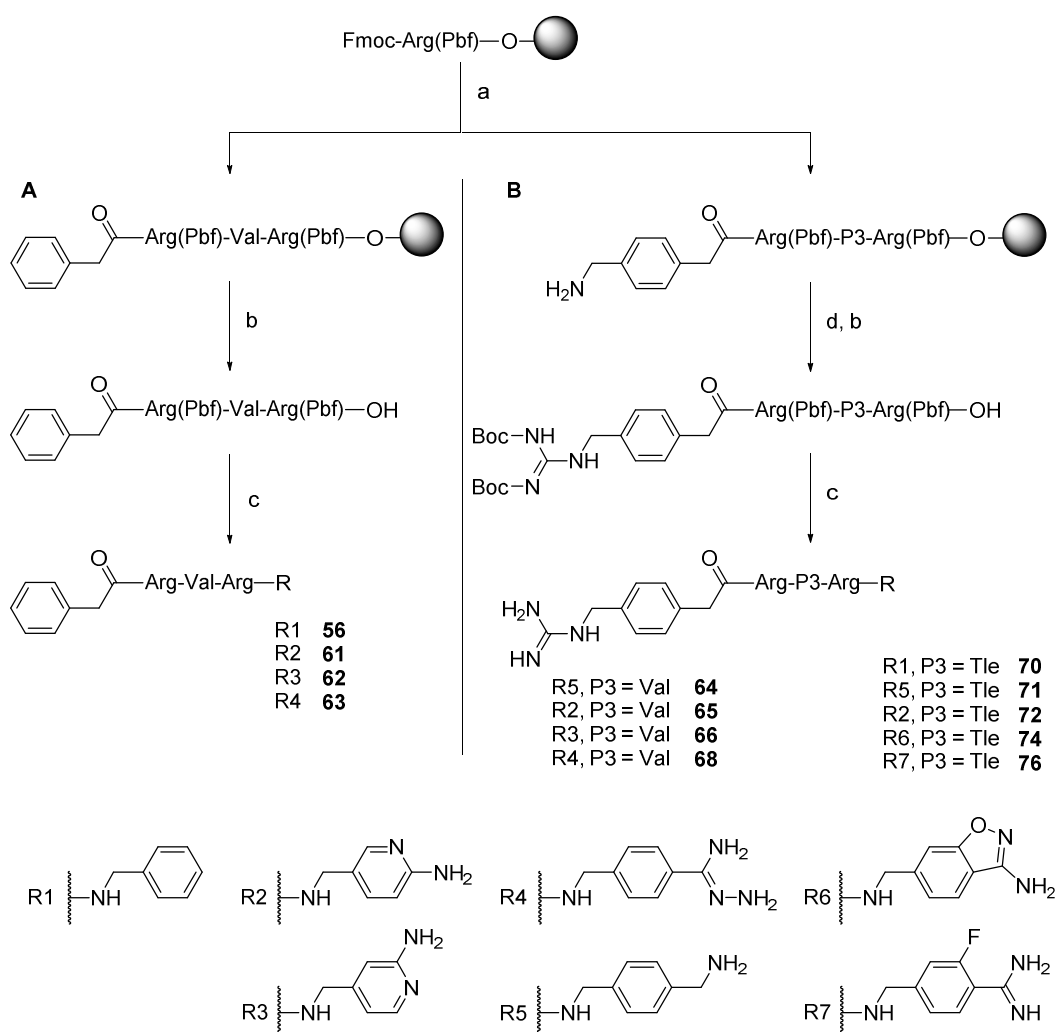


Schema 8: Synthese der Verbindungen **92-95** und **97**, ausgehend vom Derivat **89** (Schweinitz et al., 2006).
 Reagenzien und Bedingungen: (a) 1 mol/L HCl in Eisessig, 2 h, RT; (b) DIPEA (pH ~ 8-9), 0.9 eq Fmoc-OSu, MeCN/H₂O, 1.5 h bei 0 °C, 2 h bei RT; (c) (i) 3.0 eq Acetanhydrid, Eisessig, 30 min, RT, (ii) 10 % Pd/C, H₂, 90 % CH₃COOH/H₂O (v/v), 48 h, RT; (d) 32 % HCl/H₂O (1/3, v/v), 1.5 h, RT; (e) 3.2 eq K₂CO₃, 0.9 eq Cbz-Cl, THF/H₂O (5/1, v/v), 2 h, RT; (f) 1 mol/L HCl in Ethylacetat, 1 h, RT; (g) DIPEA (pH ~ 8-9), 0.9 eq Cbz-OSu, MeCN/H₂O, 1.5 h bei 0 °C, 2 h bei RT; (h) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 1.5 h, RT.

3.1.7.4 Synthese der finalen Inhibitoren

Die Mehrheit der Verbindungen (**56**, **61-66**, **68**, **70-72**, **74** und **76**) wurde durch Aufbau des P5-P2-Segments an der festen Phase und darauffolgende Kupplung eines P1-Bausteins in Lösung (**Schema 9**) hergestellt. Ausgehend von Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz wurde das P5-P2-Segment nach einem Standard-Fmoc-Protokoll synthetisiert. Fmoc-4-AMe-Phac-OH wurde dabei wie in allen anderen Fällen im 2.5- statt im 4-fachen Überschuss eingesetzt, was aber die Qualität der Endprodukte nicht minderte. Alle Derivate mit neutralem P5-Rest wurden direkt nach

Kupplung des Phenylacetyl-Restes mit 1 % TFA in DCM unter mild-sauren Bedingungen unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom Harz abgespalten. Die *N*-terminale Aminogruppe der Verbindungen mit basischem P5-Rest wurde wie in **Kapitel 3.1.3** beschrieben in das Bis-Boc-geschützte Guanidin überführt. Erst danach wurden die harzgebundenen Peptidderivate unter milden Bedingungen von der festen Phase abgespalten und anschließend mit den verschiedenen P1-Bausteinen gekuppelt.



Schema 9: Synthese P1-modifizierter Inhibitoren mit neutralem (**A**) oder basischem (**B**) P5-Rest am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz. Reagenzien und Bedingungen: (a) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll; (b) 1 % TFA in DCM (v/v), 3×30 min, RT; (c) (i) 1.5 eq der entsprechenden Aminokomponente (Benzylamin für Inhibitoren **56** und **70**, Verbindung **98** für Inhibitoren **61**, **65** und **72**, Verbindung **100** für Inhibitoren **62** und **66**, Verbindung **80** für Inhibitoren **63** und **68**, Verbindung **99** für Inhibitoren **64** und **71**, Verbindung **85** für Inhibitor **74** und Verbindung **87** für Inhibitor **76**), 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, 3.0 eq DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT, (ii) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 3 h, RT, (iii) nur für Inhibitoren **64** und **71**: 0.5 mL NaOH (1 mol/L), 3 mL Dioxan/H₂O (2/1, v/v), 2 h, RT; (d) 3.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 4.0 eq DIPEA, DMF, RT über Nacht.

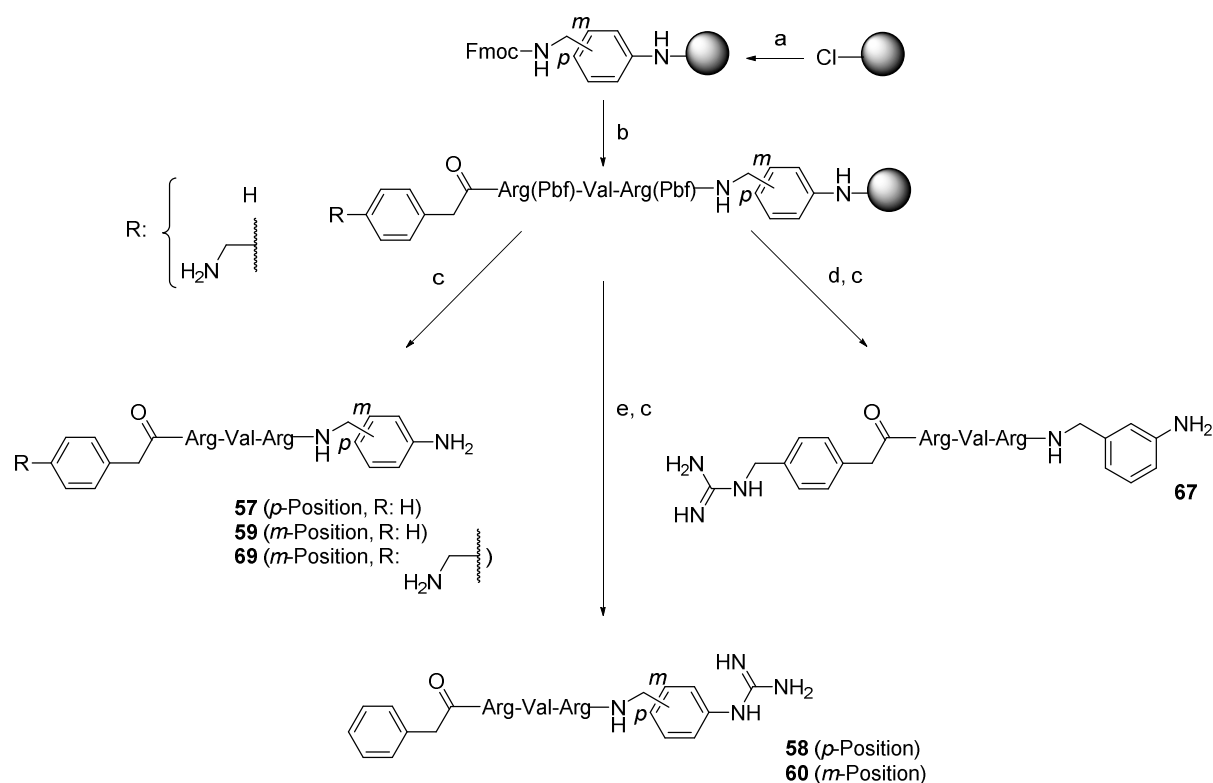
Dazu wurden mehrere niedermolekulare Bausteine eingesetzt: Das einfache Benzylamin wurde kommerziell erhalten, die Derivate **98** und **99** stammten aus früheren Arbeiten (Dönnecke et al., 2007; Hinkes et al., 2016). Die Verbindung **100** wurde durch Hydrierung aus 2-Amino-4-cyanopyridin dargestellt. Die Synthesen der Derivate **80**, **85** und **87** wurden bereits erklärt (**Schema 6**, **Schema 7**).

Nach Vervollständigung der Kupplungsreaktion (Kontrolle mittels HPLC) wurden die Verbindungen mit 95 % TFA für 3 h bei RT behandelt. Falls die Schutzgruppen nicht vollständig entfernt werden konnten, wurde die Abspaltung nochmals wiederholt. Anschließend wurde der Tfa-Schutz des P1-Restes zur Synthese der Inhibitoren **64** und **71** durch Behandlung mit Natronlauge in Dioxan/H₂O für 2 h bei RT entfernt.

Ein alternativer Syntheseweg für den Amidrazon-Inhibitor **68** (**Schema 9**), ausgehend von der analogen Amidin-Verbindung **3**, wurde im Rahmen eines Testansatzes nach einer beschriebenen Methode für niedermolekulare Verbindungen ausprobiert (Neunhoffer and Weischedel, 1971). Dazu wurde die Verbindung **3** in MeOH gelöst und mit Hydrazinhydrat im Überschuss für 2 h bei RT behandelt. Die anschließende HPLC-Kontrolle zeigte einen kompletten Umsatz ohne Bildung von Nebenprodukten an. Somit wurde die in der Literatur beschriebene Synthese der Amidrazone aus den entsprechenden Amidinen erfolgreich mit Peptidstrukturen angewendet.

Einige der Inhibitoren (**57-60**, **67** und **69**) wurden durch initiale Immobilisierung eines P1-Bausteins am Harz und anschließende schrittweise Ankupplung des P5-P2-Segments dargestellt (**Schema 10**). Die eingesetzten Verbindungen **101** und **102** wurden durch Umsetzung der entsprechenden Aminomethylaniline mit Fmoc-OSu erhalten. Die reaktivere und sterisch zugänglichere aliphatische Aminogruppe reagiert bevorzugt, sodass nur diese und nicht das Anilin mit Fmoc geschützt wird. Dies wurde mittels NMR-Analytik bestätigt (Anhang, S. XXXVIII-XLI).

Nach Beladung eines Tritylchlorid-Harzes mit dem entsprechenden Fmoc-geschützten Amidomethylanilin wurden die folgenden Reste mittels Fmoc-SPPS angekuppelt. Die Inhibitoren **57**, **59** und **69** wurden nach Kupplung des *N*-terminalen Restes und ggf. Entfernung des Fmoc-Schutzes direkt durch Behandlung der harzgebundenen Intermediate unter stark sauren Bedingungen abgespalten. Auf ähnliche Weise wurde auch der Inhibitor **67** erhalten, vor der terminalen Abspaltung wurde jedoch dessen *N*-terminale Aminogruppe am P5-Rest noch in ein Guanidin überführt.



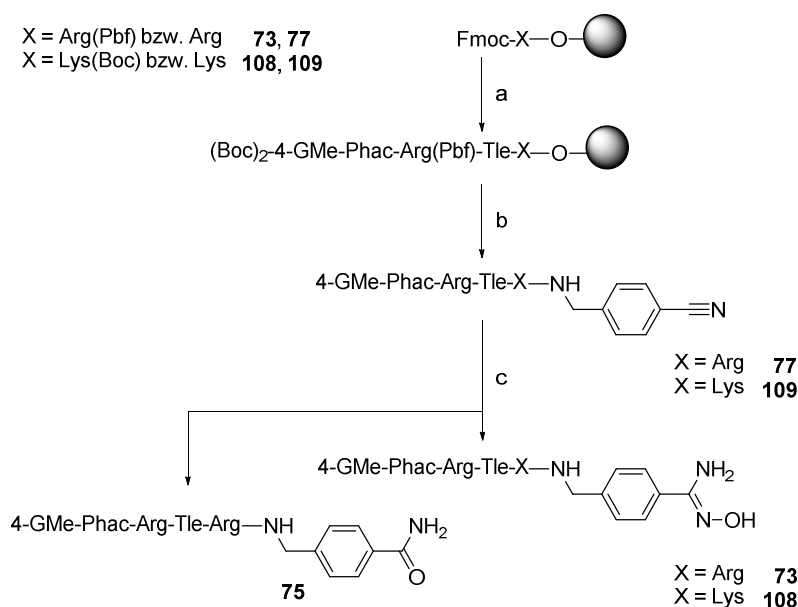
Schema 10: Synthese P1-modifizierter Derivate am Tritylchlorid-Harz. Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) 2.0 eq Fmoc-*p*-(Amidomethyl)anilin (**101**) oder Fmoc-*m*-(Amidomethyl)anilin (**102**), 4.0 eq DIPEA, 4 % DMSO in trockenem DCM (v/v), 2 h, RT, (ii) DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, v/v/v), 3×1 min, RT; (b) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll; (c) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 3 h, RT; (d) 3.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 4.0 eq DIPEA, DMF, RT über Nacht; (e) (i) 1 % TFA in DCM (v/v), 3×30 min, RT, (ii) 8.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, DIPEA (pH ~ 9-10), DMF, 72 h, RT.

Nach Kupplung des *N*-terminalen Phenylacetyl-Restes wurden die Intermediate zur Synthese der Inhibitoren **58** und **60** zunächst mit 1 % TFA in DCM vom Harz abgespalten. Anschließend wurde das *C*-terminale Anilin in ein Guanidin überführt. Dazu wurde das in DMF gelöste Peptid anfangs mit jeweils 5 eq 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin×HCl versetzt, der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von DIPEA auf ~9-10 eingestellt. Das Kontrollchromatogramm nach 24 h Rühren bei RT zeigte keinerlei Umsatz. Das 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin×HCl wurde ursprünglich für die Umsetzung aliphatischer Amine entwickelt (Bernatowicz et al., 1992), aromatische Amine sind jedoch deutlich reaktionsträger. Aus diesem Grund wurden 5.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin zum Ansatz zugegeben. Das zweifach Boc-geschützte Reagenz ist reaktiver und eignet sich besser zur Umwandlung aromatischer Amine in Guanidine (Sperl et al., 2000). Nach einer Reaktionszeit von etwa 24 h mit diesem Reagenz wurde ein deutlicher Umsatz festgestellt. Es mussten jedoch noch weitere 3 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin zugegeben werden, und nach einer Gesamtreaktionszeit von 72 h war das entsprechende Edukt im

Chromatogramm nicht mehr sichtbar. Für diese Umsetzung wäre es besser gewesen, die noch deutlich reaktiveren Triflyldiurethan-geschützten Guanidine einzusetzen, die auch kommerziell erhältlich sind (Feichtinger et al., 1998a; Feichtinger et al., 1998b). Zum Schluss wurden die Schutzgruppen mithilfe der üblichen stark sauren TFA-Abspaltung entfernt (**Schema 10**).

3.1.7.5 Synthese des Hydroxyamidin-Inhibitors **73**

Die Darstellung und vor allem die Reinigung des Inhibitors **73** (**Schema 11**) mit einem aromatischen Hydroxyamidin in P1-Position bereitete einige Probleme. Es wurden mehrere Strategien zur Darstellung dieses Derivats ausprobiert.



Schema 11: Synthese einiger P1-modifizierter Inhibitoren am Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz für die Derivate mit Arginin bzw. Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz für die Verbindungen mit Lysin in P2-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) Fmoc-Festphasenpeptidsynthese nach Standardprotokoll, (ii) 3.0 eq *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 4.0 eq DIPEA, DMF, RT über Nacht; (b) (i) 1 % TFA in DCM (v/v), 3 × 30 min, RT, (ii) 1.5 eq 4-(Aminomethyl)benzonitril × HCl, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, 3.0 eq DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT, (iii) TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 3 h, RT; (c) 1.5 eq Hydroxylamin × HCl, 1.5 eq DIPEA, EtOH, Rückfluss, 6 h (bei dieser Umsetzung entsteht aus dem Nitril in geringen Mengen als Nebenprodukt das Carboxamid, das als weiterer Inhibitor **75** mittels präparativer HPLC isoliert und charakterisiert wurde).

Anfangs wurde die in **Schema 9** dargestellte Syntheseroute mehrmals ausprobiert. Das P5-P2-Segment wurde an der festen Phase aufgebaut und nach Überführung der *N*-terminalen Aminogruppe in das entsprechende Guanidin wurde das Peptid mit 1 % TFA in DCM mild vom Harz abgespalten. An den freien C-Terminus wurde anschließend das Derivat **94** gekuppelt. Die

Synthese dieses niedermolekularen Bausteins wurde bereits beschrieben (**Schema 8**). Die HPLC-Kontrolle der Kupplungsreaktion zeigte zwar das gewünschte Produkt, jedoch auch mehrere Nebenprodukte, die massenspektrometrisch nicht identifiziert werden konnten. Denkbar ist eine inverse Kupplung des P1-Bausteins über die Hydroxyamidin-Seite oder im Falle eines deutlich hydrophoberen Nebenprodukts eine Dimerisierung, also eine gleichzeitige Kupplung der aliphatischen Aminogruppe und des Hydroxyamidins. Diese Nebenreaktionen wurden bei der Kupplung des 4-Amba-Restes nicht beobachtet, da sich Amidine in der Regel nur unter stärker basischen Bedingungen durch Umsetzung mit Säurechloriden acylieren lassen.

Diese Syntheseroute lieferte letztendlich in der Tat Inhibitor **73**, jedoch jedes Mal in sehr geringer Ausbeute. Eine Möglichkeit, der Dimerisierung vorzubeugen, ist die Blockierung der Hydroxyamidin-Seite des P1-Bausteins vor der Peptidkupplung durch eine geeignete Schutzgruppe. Zu diesem Zweck wurde versucht, das Derivat **97a** (**Schema 8**) mit freier aliphatischer Aminogruppe und Cbz-geschütztem Hydroxyamidin darzustellen. Dies könnte über die aliphatische Aminogruppe an das Peptid gekuppelt werden und die finale Abspaltung der Cbz-Gruppe würde den Inhibitor **73** liefern. Dadurch wären die inverse Kupplung oder die Dimerisierung praktisch ausgeschlossen. Wie zuvor beschrieben, konnte allerdings der am Hydroxyamidin Cbz-geschützte P1-Baustein über den in **Schema 8** dargestellten Syntheseweg nicht hergestellt werden – stattdessen wurde das an der aliphatischen Aminogruppe Cbz-geschützte Derivat **97** erhalten, das für die weitere Synthese des Inhibitors **73** unbrauchbar war.

Um eine Dimerisierung auszuschließen, könnte alternativ versucht werden, den P1-Baustein über die Hydroxyamidin-Gruppe am Tritylchlorid-Harz zu immobilisieren und daran das restliche Peptidsegment aufzubauen. Für diesen Zweck wurde der Baustein **95** hergestellt (**Schema 8**). Da bei diesem Syntheseweg die Behandlung mit 95 % TFA zwingend erforderlich, aber aus den weiter unten erklärten Gründen unerwünscht war, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt. Erwähnenswert bei der Synthese dieses Fmoc-geschützten Derivates ist jedoch das hydrophobe Nebenprodukt, das mittels Massenspektrometrie als das an beiden Seiten Fmoc-geschützte Derivat identifiziert wurde. Durch rechtzeitige Zugabe von DIPEA und Aufrechterhalten eines ausreichend hohen pH-Wertes (> 8) konnte die Bildung dieses Nebenproduktes weitestgehend vermieden werden.

Ein anderes Problem bei der Darstellung des Inhibitors **73** neben der Dimerisierung und der vermuteten inversen Kupplung war eine anfangs unbemerkte Verunreinigung mit dem entsprechenden Benzamidin-Derivat (Verbindung **4**). Unter den standardmäßig angewendeten HPLC-Bedingungen weisen das Benzamidin und das entsprechende Hydroxyamidin identische Retentionszeiten auf, sodass diese Verunreinigung in den HPLC-Kontrollen nicht detektierbar war.

Die Verunreinigung des Hydroxyamidins mit dem Amidin wurde jedoch massenspektrometrisch und bei der enzymkinetischen Charakterisierung nachgewiesen (**Kapitel 3.2.2.6**).

Daher wurde eine geeignete HPLC-Methode etabliert, die eine bequeme Trennung analoger Amidin/Hydroxyamidin-Paare (z.B. Inhibitoren **4** und **73**) gestattet. Als Laufmittel A wurde wässriger Ammoniumacetat-Puffer (20 mmol/L, pH 4.0) genutzt, als Laufmittel B pures Acetonitril. Im Gegensatz zu einer früher beschriebenen isokratischen Methode mit den gleichen Laufmitteln (Kotthaus et al., 2011) wurde jedoch eine Gradientenmethode etabliert, die zur Analyse von Amidin/Hydroxyamidin-Paaren unterschiedlicher Hydrophobizität geeignet ist. Bei einem pH-Wert von 4 liegt das stark basische aromatische Amidin vollständig protoniert vor, während das schwächer basische Hydroxyamidin ($pK_a \sim 5$) zum Teil deprotoniert ist. Das geladene Amidin ist polarer und hydrophiler, deshalb eluieren die Benzamide bei kürzerer Retentionszeit im Vergleich zu den analogen Hydroxyamiden. Unter den üblichen HPLC-Bedingungen (Elutionsmittel versetzt mit 0.1 % TFA, pH 1.88) sind beide Spezies vollständig protoniert und dementsprechend nicht unterscheidbar.

Auch im Rahmen der alternativen chromatographischen Trennung wurde eine Gradienten-Elution mit einem konstanten Anstieg der MeCN-Konzentration von 1 % pro Minute verwendet, die Unterschiede der Retentionszeiten beider Derivate beträgt ca. 1 min (**Abbildung 17**). Das Chromatogramm zeigte eine geringe (ca. 1 %) bis beträchtliche (über 50 %) Verunreinigung der verschiedenen Chargen des Hydroxymamidin-Inhibitors **73** mit dem Amidin **4**. Da der Inhibitor **4** Furin mit einem K_i -Wert von 5.5 pM hemmt (Hardes et al., 2015), sind auch sehr geringe Verunreinigungen des Hydroxyamidins durch ein Amidin nicht akzeptabel und würden zur Bestimmung falscher Hemmkonstanten führen.

Es wurde angenommen, dass das Hydroxyamidin in Gegenwart starker Säuren, z.B. konz. TFA, instabil ist und teilweise zum entsprechenden Amidin zerfällt. Um die finale Behandlung mit 95 % TFA zu vermeiden, wurde ein alternativer Syntheseweg ausprobiert (**Schema 11**, S. 51). Dabei wurde 4-(Aminomethyl)benzonitril an das mild vom Harz abgespaltene Intermediat gekuppelt und anschließend die Pbf-Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten. Ein Teil der erhaltenen gereinigten Nitril-Verbindung wurde als Inhibitor **77** charakterisiert. Erst danach wurde das Nitril in P1-Position mittels Hydroxylamin in das Hydroxyamidin überführt. Als geringes Nebenprodukt bei dieser Umsetzung, dessen Entstehung sich auch nicht durch Erhitzen unter Schutzgas und nach Zugabe von Molsieb zum Ansatz vermeiden ließ, wurde das entsprechende Carboxamid erhalten und als Inhibitor **75** isoliert und charakterisiert. Der Anteil des Nebenproduktes war desto kleiner, je konzentrierter der Ansatz war.

Zum Schluss wurde der Inhibitor **73** gereinigt und konnte erstmals ohne Benzamidin-Verunreinigung dargestellt werden.

Bei einer wiederholten Synthese nach der gleichen Route entstanden jedoch – trotz Vermeidung jeglicher Behandlung mit 95 % TFA nach Aufbau des Hydroxyamidins – in der HPLC detektierbare Mengen an Benzamidin (ca. 1-2 %, **Abbildung 17C**). Dies widerlegte die ursprüngliche Annahme, dass diese Verunreinigung nur im stark sauren Milieu entsteht. Möglicherweise reichen auch die niedrigen Konzentrationen an TFA während der präparativen Reinigung bei pH 1.88 und der anschließenden Konzentrierung der Lösung für den Zerfall des Hydroxyamidins aus. Da jedoch die Entstehung der Verunreinigung an sich sowie deren Ausmaß nicht reproduzierbar sind, ist auch der exakte Grund dafür zu diesem Zeitpunkt unklar. Es konnte allerdings mindestens geklärt werden, dass das lyophilisierte Hydroxyamidin-Derivat bei Lagerung im Kühlschrank stabil ist, da bei einer Testung der verschiedenen Chargen nach einigen Monaten die gleichen Anteile an Benzamidin-Verunreinigung in den HPLC-Chromatogrammen zu sehen waren.

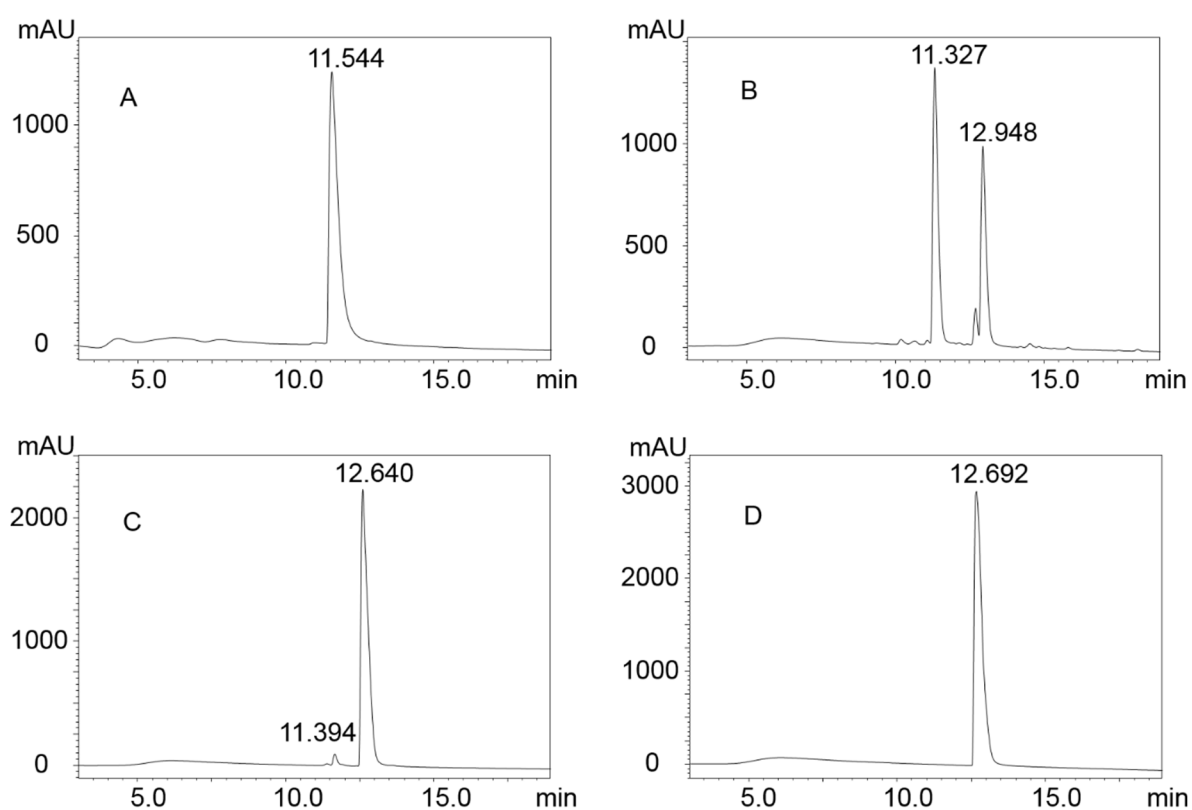
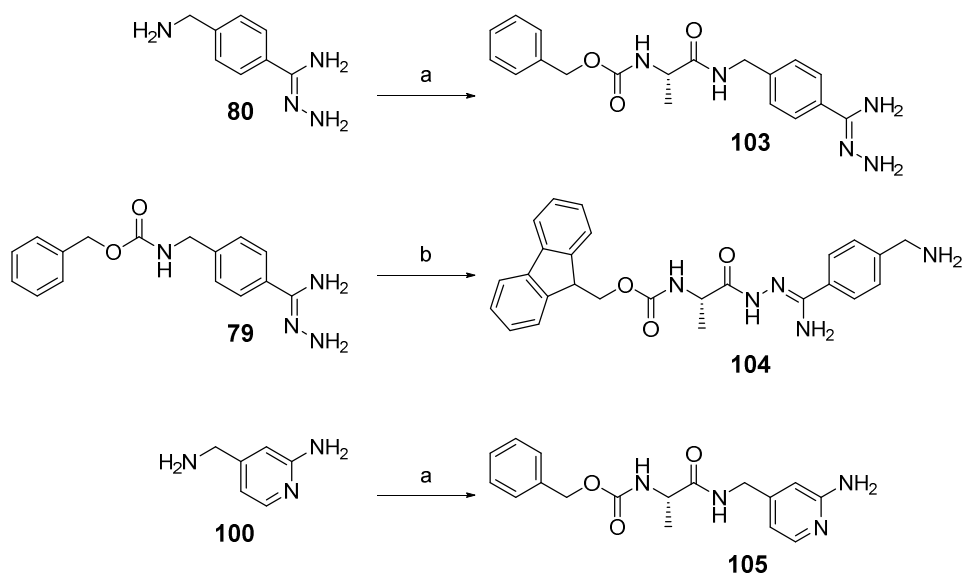


Abbildung 17: Chromatogramme der Verbindungen **4** und **73**. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch aus Ammoniumacetat-Puffer (pH 4) und Acetonitril verwendet. Alle HPLC-Trennungen starteten bei 1 % Acetonitril und wurden unter einem konstanten Anstieg der MeCN-Konzentration von 1 % pro Minute durchgeführt. **A:** Verbindung **4** (Referenz); **B:** Eine Charge des Rohproduktes der Verbindung **73**, die stark mit Verbindung **4** verunreinigt ist; **C:** Eine Charge der Verbindung **73**, die etwa 1 % Verbindung **4** als Verunreinigung enthält; **D:** Inhibitor **73** nach präparativer Reinigung bei pH 4.

Da die wenn auch zum Teil geringe Benzamidin-Verunreinigung die enzymkinetische Charakterisierung deutlich beeinträchtigt (**Kapitel 3.2.2.6**), wurden letztendlich kleine Mengen einer wenig verunreinigten Charge des Inhibitors **73** mittels präparativer HPLC unter den geeigneten Bedingungen (pH 4, MeCN-Konzentrationsanstieg bei der präparativen Trennung: 0.5 % pro Minute) gereinigt, lyophilisiert und als Acetat-Salz erhalten (**Abbildung 17D**). Für die pH-Wert-Einstellung des Puffers wurde Essigsäure verwendet, um die Kontamination mit weiteren Fremdionen zu vermeiden. Das im Puffer vorhandene Ammoniumacetat kann bekanntermaßen durch wiederholtes Lyophilisieren aus Wasser vollständig entfernt werden. Dies wurde experimentell durch parallele Lyophilisation von reinem Puffer bestätigt.

3.1.7.6 Probesynthesen

Einige der verwendeten P1-Bausteine besitzen zwei ungeschützte funktionelle Gruppen, die prinzipiell beide acylierbar sind. In diesen Fällen musste geprüft werden, dass die gewünschte funktionelle Gruppe, nämlich das aliphatische Amin, bevorzugt reagiert. Zu diesem Zweck wurden mit diesen ungeschützten Derivaten Probekupplungen an willkürlich ausgewählte niedermolekulare Carbonsäuren durchgeführt (**Schema 12**, erste und dritte Reaktion). Die Produkte (Verbindungen **103** und **105**) wurden gereinigt und mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie untersucht. Als Referenzverbindung für die NMR-Analytik wurde zusätzlich das invers gekuppelte Derivat **104** der Verbindung **80** dargestellt. Dafür wurde das aliphatische Amin zuerst mit Cbz geschützt, sodass anschließend nur die Amidrazon-Funktion acyliert werden konnte (**Schema 12**, zweite Reaktion). Bei dieser Umsetzung wurde auch das erwartete Produkt (Verbindung **104**) erhalten. Anhand der NMR-Spektren aller Produkte (Anhang, S. XLIII-XLVI) konnte eindeutig bestätigt werden, dass das aliphatische Amin der ungeschützten Bausteine **80** und **100** trotz geringer Nebenreaktionen bevorzugt acyliert wird. Bei der Verbindung **100** ist das aliphatische Amin ebenfalls reaktiver. Durch Strukturbestimmung mittels Neutronenbeugung wurde vor Kurzem festgestellt, dass 2-Aminopyridin, gebunden in der S1-Tasche des Trypsins, nur am Stickstoff im Ring protoniert ist, nicht jedoch an seiner aromatischen Aminogruppe (Schiebel et al., 2017).



Schema 12: Probesynthesen, ausgehend von 1.5 eq des jeweils abgebildeten Eduktes. Reagenzien und Bedingungen: (a) 1.0 eq Cbz-Ala-OH, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, DIPEA (pH ~ 9), DMF, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT; (b) (i) 1.0 eq Fmoc-Ala-OH, 1.65 eq PyBOP, 4.5 eq 6-Cl-HOBt, DIPEA (pH ~ 9), DCM, 15 min bei 0 °C, 4 h bei RT, (ii) 32 % HBr in Eisessig, 1 h, RT.

3.1.8 Derivate mit Lysin in P2-Position

Der wirksamste bisher bekannte Furininhibitor **4** besitzt neben dem Benzamidin in P1-Position drei weitere stark basische Guanidinofunktionen in den Positionen P2, P4 und P5. Nach allen bisherigen Erkenntnissen ist das Benzamidin in P1-Position zwingend erforderlich, um eine Wirksamkeit der Hemmstoffe in Zellkultur zu erzielen. Andererseits scheint es in Verbindung mit den drei anderen Guanidinogruppen zur toxischen Wirkung dieses Inhibitors beizutragen (**Kapitel 3.5**). Daher wurde vermutet, dass der Verlust einer der drei Guanidinofunktionen unter Erhalt des Benzamidins zu einer Verbesserung des toxikologischen Profils ohne dramatische Auswirkungen auf die Hemmwirkung führen könnte. In einer Serie von Verbindungen ohne basischen P5-Rest wurde in früheren Arbeiten festgestellt, dass der Austausch des P4-Arg durch Lys einen drastischen Affinitätsverlust um den Faktor 350 bewirkt (Becker et al., 2011), dagegen wird der Ersatz des P2-Arg durch Lys relativ gut akzeptiert (Becker et al., 2011; Becker et al., 2010). Aus diesem Grund wurde das Arg in P2-Position des Inhibitors **4** durch den schwächer basischen Lys-Rest ersetzt (Verbindung **106**, 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba). Die Derivate mit neutralem P5-Rest (Verbindung **107**, Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba) oder P1-Hydroxyamidin als Amidin-*prodrug* (Verbindung **108**, 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba(OH)) wurden als Referenzverbindungen für künftige *in vivo*-Untersuchungen dargestellt.

Die Synthese der P1-4-Amba-Inhibitoren **106** und **107** verlief nach dem bekannten Syntheseweg (Festphasensynthese des P5-P2-Segments mit anschließender 4-Amba-Kupplung in Lösung). Die Inhibitoren **108** (P1-Hydroxyamidin) und **109** (P1-Cyanobenzylamid) wurden analog der entsprechenden Derivate mit Arginin in P2-Position (**73**, **77**) dargestellt (**Schema 11**, S. 51).

Analog zum Hydroxyamidin-Inhibitor **73** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba(OH)) war auch der Hemmstoff **108** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba(OH)) mit kleinen Mengen (etwa 1-2 %) des entsprechenden Amidin-Derivats (**106**) verunreinigt. Aus diesem Grund musste er auch mit den modifizierten HPLC-Bedingungen bei pH 4 präparativ gereinigt werden und wurde als lyophilisiertes Acetat-Salz erhalten.

3.2 Enzymkinetik

Die im Rahmen dieser Arbeit neu hergestellten Substrate, Inhibitoren und zusätzlich noch einige Referenzverbindungen wurden enzymkinetisch mit der Proproteinkonvertase Furin charakterisiert. Alle Versuche basieren auf der enzymatischen Spaltung eines fluorogenen AMC-Substrates. Je nach Sequenz unterscheiden sich die neuen Substrate deutlich in ihrer Spaltbarkeit durch Furin. Durch Zugabe eines Inhibitors zum Messansatz wird die Geschwindigkeit der AMC-Freisetzung entsprechend reduziert; dadurch können die Hemmparameter der einzelnen Inhibitoren bestimmt werden.

3.2.1 Charakterisierung der AMC-Substrate

Zunächst wurden für jedes Substrat die Messdaten für eine Michaelis-Menten-Auftragung bestimmt. Dabei werden verschiedene Substratkonzentrationen mit einer konstanten, aber deutlich niedrigeren Enzymkonzentration versetzt und die AMC-Freisetzung, also der Anstieg der Fluoreszenz, detektiert. Die entsprechenden Geschwindigkeiten werden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen (**Abbildung 18**), und man erhält einen hyperbolen Kurvenverlauf. Die Daten werden an die Michaelis-Menten-Gleichung (**Gleichung 6**, Seite 190) angepasst – auf diese Weise erhält man die enzymkinetischen Parameter V_{\max} (maximale Geschwindigkeit der ungehemmten enzymatischen Reaktion) und K_M (Michaelis-Menten-Konstante) des jeweiligen Substrates. Die V_{\max} - und K_M -Werte aller Substrate sind in **Tabelle 3** zusammengefasst. Als Referenzverbindung wurde das im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig verwendete Substrat **7** (Becker, 2011; Harges, 2014) benutzt.

Darüber hinaus wurden die k_{cat} - bzw. k_{cat}/K_M -Werte der Substrate bestimmt (**Tabelle 3**). Die katalytische Konstante k_{cat} , auch Wechselzahl genannt, gibt die maximale Anzahl an Substratmolekülen an, die pro Zeiteinheit durch ein aktives Zentrum des Enzyms umgesetzt werden. Mit anderen Worten, die katalytische Konstante stellt die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes zum Produkt und freien Enzym dar.

Die Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_M) gibt an, wie effizient ein Enzym ein bestimmtes Substrat zum Produkt umsetzt oder – im Rahmen der Substratoptimierung – wie geeignet ein bestimmtes Substrat für das entsprechende Enzym ist. Da V_{\max} proportional zu k_{cat} ist, ist auch das Verhältnis V_{\max}/K_M proportional zur Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M .

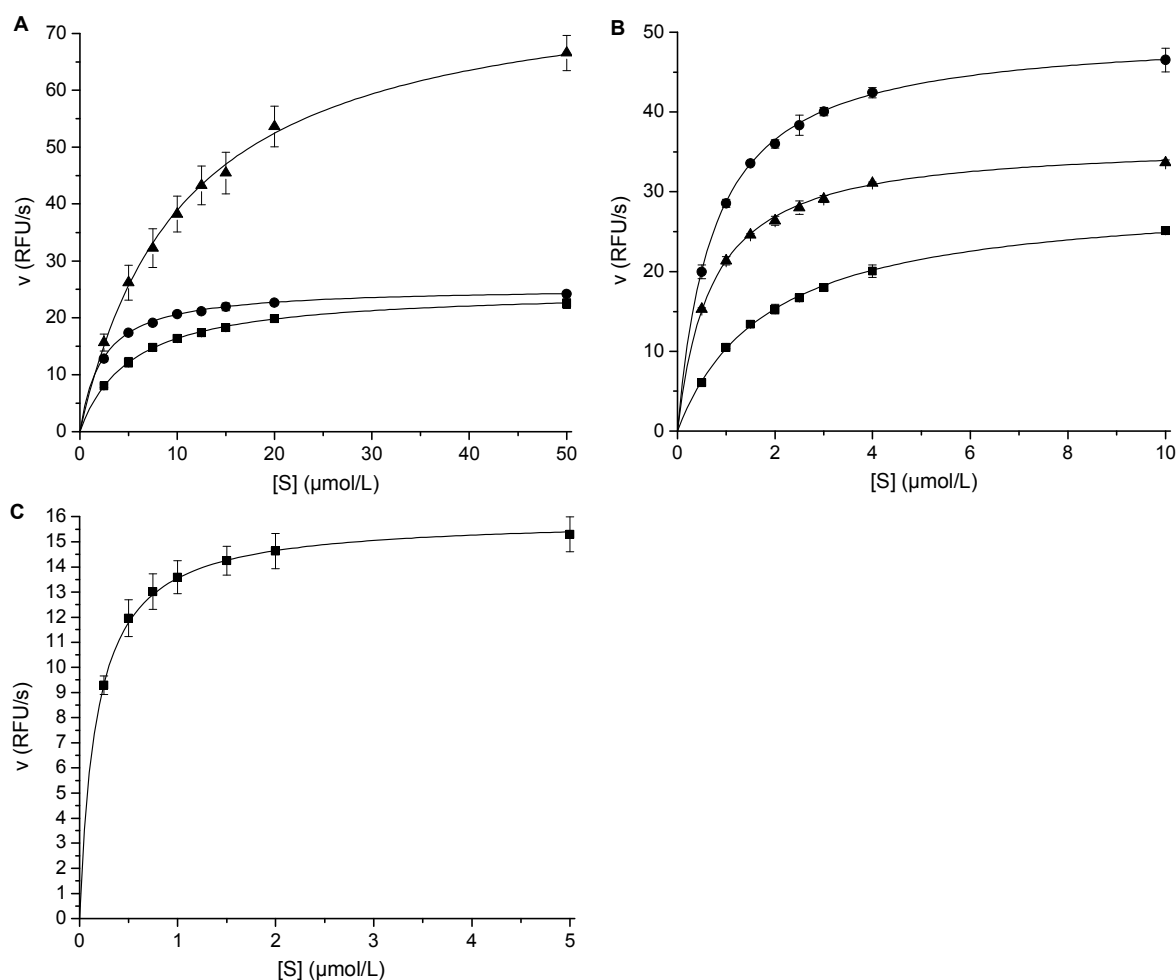


Abbildung 18: Michaelis-Menten-Auftragungen der furinkatalysierten Spaltung verschiedener AMC-Substrate. A: Verbindungen 7 (■), 8 (●) und 9 (▲); B: Verbindungen 10 (■), 12 (●) und 13 (▲); C: Verbindung 11.

Die Spezifitätskonstanten der neu synthetisierten AMC-Furinsubstrate wurden durch zwei Methoden ermittelt. Bei der ersten Methode wurden die Fluoreszenzänderungen der Substratspaltung mittels einer AMC-Eichkurve in Reaktionsgeschwindigkeiten umgerechnet und daraus bei bekannter Enzymkonzentration der k_{cat} -Wert ausgerechnet (Becker, 2011). (**Gleichung 7**, S. 191). Die zweite Methode basiert auf der Anpassung der Zeit-Umsatz-Kurven (Progresskurven) bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen ($S < 10 \times K_M$) an die Formel einer Reaktion erster Ordnung (Neumann et al., 2004; Paschalidou et al., 2004; Stein, 1985) (**Gleichung 8**, S. 192). Die anschließende Umrechnung nach **Gleichung 9** auf S. 193 liefert direkt den k_{cat}/K_M -Wert (**Abbildung 19**). Obwohl sich durch die zwei Methoden bei manchen Verbindungen gewisse Abweichungen in den absoluten Werten ergaben, sind die Tendenzen sehr ähnlich.

Tabelle 3: AMC-Substrate für Furin.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	V_{\max} RFU/s	K_M μM	k_{cat}^1 1/s	k_{cat}/K_M^1 L/(mol·s)	k_{cat}/K_M^2 L/(mol·s)
7 ³				24.99	5.26	0.61	116208	114736
8				25.37	2.32	0.58	248940	236842
9				80.46	10.68	1.84	172027	228421
10				29.50	1.85	0.69	375080	542105
11				15.94	0.18	0.37	2083001	5536842
12				50.03	0.74	1.18	1590276	3989474
13				36.31	0.70	0.85	1220118	2094737

¹bestimmt mithilfe der AMC-Eichkurve

²bestimmt nach der Progresskurven-Methode

³synthetisiert von Dr. Gero Becker

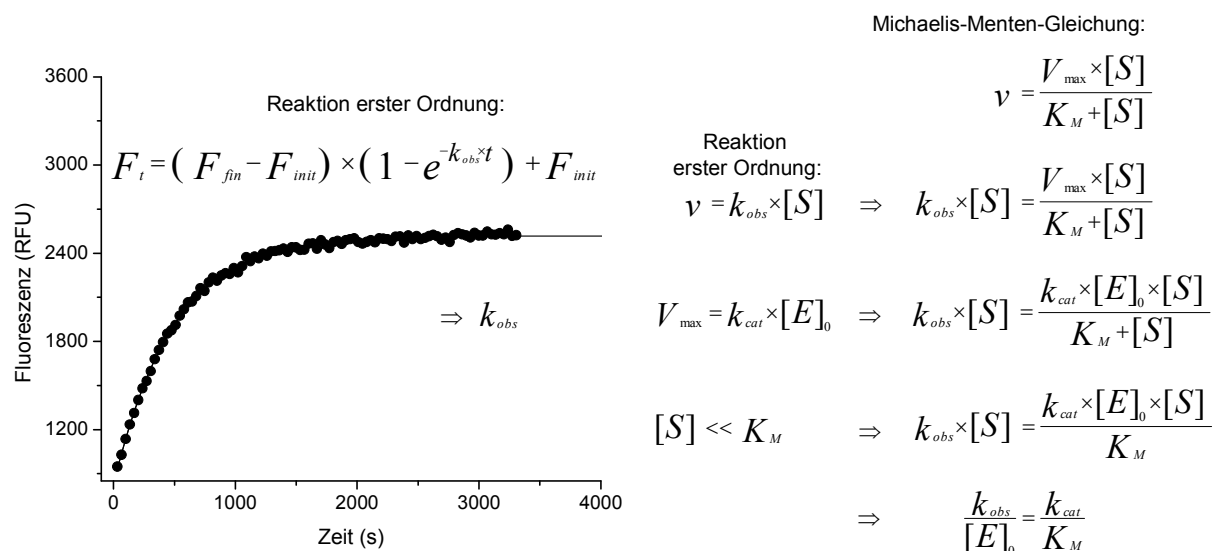


Abbildung 19: Bestimmung des k_{cat} - bzw. k_{cat}/K_M -Wertes für das Substrat **12** durch Auswertung der Zeit-Umsatz-Kurve (Progresskurve) (Neumann et al., 2004; Paschalidou et al., 2004; Stein, 1985). Zunächst wurde durch Anpassung der Progresskurve an die Formel einer Reaktion erster Ordnung die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} bestimmt (links). Durch Division dieses Wertes durch die Enzymkonzentration $[E]_0$ wird direkt der k_{cat}/K_M -Wert erhalten (rechts). Die Messung erfolgte bei einer Substratkonzentration (Substrat **12**) von 0.06 $\mu\text{mol/L}$ und Enzymkonzentration von 0.95 nmol/L im Messansatz (F_t : Fluoreszenz zum Zeitpunkt t ; F_{fin} : finale Fluoreszenz in der Plateau-Phase der Progresskurve; F_{init} : initiale Fluoreszenz zu Beginn der Messung; k_{obs} : scheinbare (apparente) Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung; t : Zeit; v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[S]$: Substratkonzentration; $[E]_0$: Enzymkonzentration; k_{cat} : Wechselzahl; maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit; K_M : Michaelis-Menten-Konstante).

Unter den Substraten mit dem Phenylacetyl-Rest in P5-Position wurden die P2- und P3-Reste variiert (**Tabelle 3**). Der Austausch des P2-Arginins im Substrat **7** durch ein Lysin (Verbindung **8**) führte erstaunlicherweise zu einer Senkung des K_M -Wertes, obwohl Inhibitoren mit einem P2-Arg bekanntermaßen einen etwas niedrigeren K_i -Wert (Faktor 2-3) als analoge Verbindungen mit Lys besitzen (Becker et al., 2010). Der V_{\max} -Wert wurde durch diese Variation kaum beeinflusst. Ein unerwarteter Effekt wurde auch bei dem Austausch des P3-Val (Verbindung **7**) mit einem *tert*-Leucin (Verbindung **9**) beobachtet. Diese Substitution führt bei Furininhibitoren zu niedrigeren Hemmkonstanten (Faktor 3) (Hardes et al., 2015), während das Substrat mit P3-Tle einen markant höheren K_M -Wert besitzt. Dafür wurde der V_{\max} -Wert etwa um den Faktor 3 vergrößert. Interessanterweise verbesserte die Kombination aus P2-Lys und P3-Tle den V_{\max} -Wert leicht und den K_M -Wert etwa um den Faktor 3, sodass sich das Derivat **10** als das effizienteste Substrat mit der größten Spezifitätskonstante in dieser Serie mit dem Phac-Rest in P5-Position erwies.

Im Gegensatz zu diesen acylierten Tetrapeptidderivaten wurden in früheren Arbeiten zur Entwicklung von Substraten des Kexin und Furin verbesserte Spaltraten mit verlängerten acylierten Hexapeptid-Verbindungen bestimmt (Jean et al., 1995; Krysan et al., 1999). Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob im Vergleich zu den Tetrapeptiden auch acylierte Pentapeptidsubstrate möglicherweise besser durch Furin gespalten werden.

Aus diesem Grund wurde bei einigen Substraten der Phenylacetyl-Rest in P5-Position durch ein *N*α-acetyliertes Arginin ausgetauscht und wieder die P2- und P3-Reste variiert. Im Vergleich zu den Verbindungen **8** und **9** führte die alleinige P5-Substitution bei den Substraten **11** und **12** zu einer niedrigeren maximalen Umsatzgeschwindigkeit. Dafür wurde jedoch der K_M -Wert in beiden Fällen sehr deutlich um den Faktor 13 reduziert. Demzufolge wurden die reduzierten V_{max} -Werte kompensiert und letztendlich deutlich effizientere Substratspaltungen mit höheren Spezifitätskonstanten bestimmt. Der Einbau des Tyrosins in P3-Position bei der Verbindung **13** führte im Vergleich zu den analogen Derivaten mit Val oder Tle zu niedrigeren k_{cat}/K_M -Werten. Basierend auf diesem Term ist die Verbindung **11** eigentlich das beste Furinsubstrat, jedoch ist es für die praktische Nutzung häufig günstiger, höhere Spaltraten zu erreichen, auch wenn dadurch der K_M -Wert etwas höher ist. Daher ist die Verbindung **12** ebenfalls ein sehr geeignetes Furinsubstrat.

Durch den Einsatz effizienterer Substrate kann die Sensitivität der enzymkinetischen Messungen gesteigert werden. Dies hat auch den Vorteil, dass man an Substrat, aber auch an Enzym sparen kann.

Da zum Zeitpunkt der Synthese der neuen AMC-Substrate die meisten Inhibitoren mithilfe des alten Substrates **7** bereits charakterisiert waren, wurde dieses weiter standardmäßig in den Messansätzen eingesetzt. Nichtsdestotrotz wurden einige Versuche im Hinblick auf die Reduktion der Substrat- und Enzymkonzentration durchgeführt. Für diese Versuche wurde das Substrat **12** mit dem zweitbesten k_{cat}/K_M -Wert verwendet, da es im Vergleich zur Verbindung **11** dreifach rascher umgesetzt wird. Der niedrigere K_M -Wert des Substrates **11** bietet praktisch keinen weiteren Vorteil, da im Falle der Verwendung sehr niedriger Substratkonzentrationen die Gefahr besteht, aufgrund eines Substratmangels den *steady state*-Bereich zu schnell zu verlassen, was bereits nach kurzer Zeit gekrümmte Progresskurven liefern würde. Aus diesen Gründen wurde die Verbindung **12** als Kompromiss zwischen der Substrateffizienz und der besseren Auswertbarkeit ausgewählt.

3.2.2 Charakterisierung der Furininhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche substratanaloge Furininhibitoren entwickelt. Deshalb wurde bei deren enzymkinetischer Charakterisierung von einem klassischen kompetitiven

Hemmmechanismus ausgegangen. Zur Bestimmung der Hemmkonstanten wurden standardmäßig acht verschiedene Inhibitorkonzentrationen bei jeweils drei Substratkonzentrationen (5, 20 und 50 $\mu\text{mol/L}$) im Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser vermessen. Bei der Auswahl der Inhibitorkonzentrationen wurde immer darauf geachtet, dass die niedrigste Konzentration mindestens 10-mal höher als die Enzymkonzentration im Messansatz war. In diesem Fall darf die Enzymkonzentration bei der Berechnung des K_i -Wertes vernachlässigt werden (**Gleichung 10**, S. 193: kompetitive Hemmung). Aus den erhaltenen Progresskurven wurden durch lineare Regression die *steady state*-Geschwindigkeiten v bestimmt. Als Substrat wurde bei allen Messungen die Verbindung **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) verwendet, da es bereits am Anfang der Arbeit zur Verfügung stand und auch bei der Charakterisierung vorheriger Inhibitoren eingesetzt wurde. Auf jeder Platte erfolgten zusätzliche Messungen in Abwesenheit des Inhibitors, um die enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_M unter identischen Bedingungen zu bestimmen (Kapitel 3.2.1). Die Hemmkonstanten (K_i) wurden durch Anpassung der Werte an die Gleichung für kompetitive Hemmung errechnet. Als Beispiel ist diese Anpassung für den Inhibitor **34** (4-Ame-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH₂) in **Abbildung 20A** gezeigt.

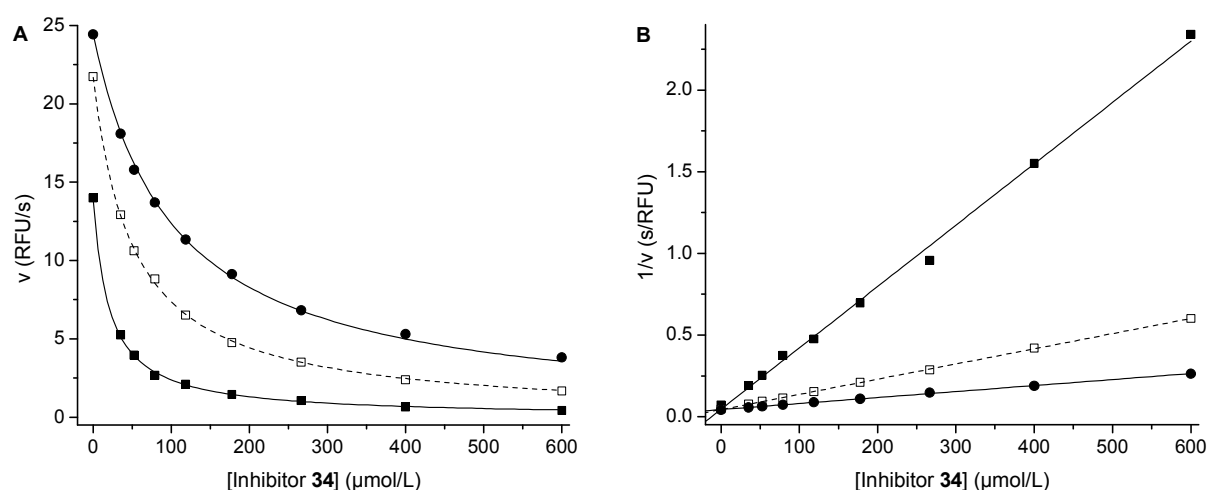


Abbildung 20: Enzymkinetische Charakterisierung des Inhibitors **34**. **A:** Anpassung der Messdaten an die Gleichung für klassische kompetitive reversible Hemmung (**Gleichung 10**, S. 193); **B:** Dixon-Auftragung. Die Hemmung wurde bei variierenden Inhibitorkonzentrationen und jeweils drei Konzentrationen des Substrates **7** gemessen: 5 (■), 20 (□) und 50 (●) $\mu\text{mol/L}$. Die Furinkonzentration betrug 0.95 nmol/L.

Ein anderes graphisches Verfahren zur Bestimmung der Hemmkonstanten ist die Methode von Dixon (Dixon, 1953). Die reziproken Geschwindigkeitswerte werden dabei als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen resultieren flachere (hohe Substratkonzentrationen) oder steilere (niedrige Substratkonzentrationen) Geraden, die einen gemeinsamen Schnittpunkt im zweiten Quadranten haben. Der entsprechende x -Wert

dieses Schnittpunkts ergibt den negativen K_i -Wert. Eine Dixon-Auftragung ist beispielhaft wiederum für die Verbindung **34** in **Abbildung 20B** gezeigt. Da bei relativ wirksamen Inhibitoren der x -Wert des Geradenschnittpunkts visuell schwer vom Nullpunkt unterscheidbar ist, wurde in der Regel auf die Auswertung mittels der graphischen Methode nach Dixon verzichtet. Die Dixon-Auftragung ist jedoch zur Identifizierung von Ausreißern sehr nützlich, da diese in einer Geraden stärker als in einer gekrümmten Darstellung auffallen.

Die Inhibitorkonzentration, die eine messbare Enzymhemmung hervorruft, ist in vielen Fällen deutlich höher als die Enzymkonzentration. Daher kann die Enzymkonzentration bei der Berechnung des K_i -Wertes vernachlässigt werden (klassische Bedingungen). Aus diesem Grund ist in der Endform der mathematischen Formel, die die klassische kompetitive Hemmung beschreibt, die Enzymkonzentration nicht enthalten (**Gleichung 10**, S. 193). Sehr wirksame Inhibitoren können jedoch auch in niedrigeren Konzentrationen zu einer deutlichen Enzyminhibition führen. Wenn diese Konzentrationen etwa im Bereich der Enzymkonzentration liegen (Inhibitorkonzentration $< 10 \times$ Enzymkonzentration), spricht man von *tight-binding*-Bedingungen (Copeland, 2005; Williams and Morrison, 1979). Zur Berechnung des K_i -Wertes wird in solchen Fällen die quadratische Morrison-Gleichung für *tight-binding*-Mechanismen benutzt, die die eingesetzte Enzymkonzentration berücksichtigt (**Gleichung 13**, S. 195). Die Messung erfolgt analog zur Messung unter klassischen Bedingungen, allerdings mit viel niedrigeren Inhibitorkonzentrationen und nur bei einer einzigen Konzentration des Substrates **7** (12.5 $\mu\text{mol/L}$ im Messansatz). Die *steady state*-Geschwindigkeiten v werden als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen und die Messdaten an die Morrison-Gleichung angepasst. In **Abbildung 21** ist die Anpassung für den Inhibitor **76** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-3-Fluor-4-amidinobenzylamid) als Beispiel gezeigt.

Es gibt keine scharf festgelegte Grenze zwischen klassischen und *tight-binding* kompetitiven Inhibitoren: In der Praxis hängt sie stark von der Qualität des verwendeten Substrates sowie der Sensitivität des Messgeräts ab. Unter den im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig genutzten Messbedingungen in Gegenwart des Substrates **7** ließen sich alle Inhibitoren mit einem K_i -Wert > 0.1 nM problemlos als klassische Inhibitoren auswerten. Wirksamere Inhibitoren mit K_i -Werten < 0.1 nM mussten unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *tight-binding*-Inhibitoren besitzen mehrere stark basische Gruppen, die für die Hemmwirkung entscheidend sind.

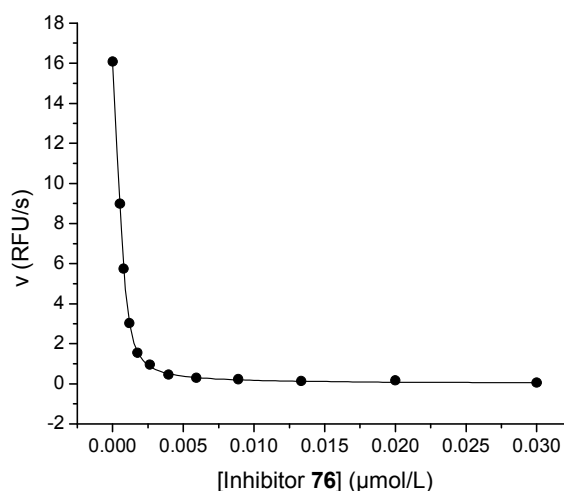


Abbildung 21: Messung unter *tight-binding*-Bedingungen und Anpassung der Werte an die Morrison-Gleichung (Copeland, 2005; Williams and Morrison, 1979) (**Gleichung 13**, S. 195) für den Inhibitor **76** (Substrat: Verbindung **7**, 12.5 μmol/L; Furinkonzentration: 0.95 nmol/L).

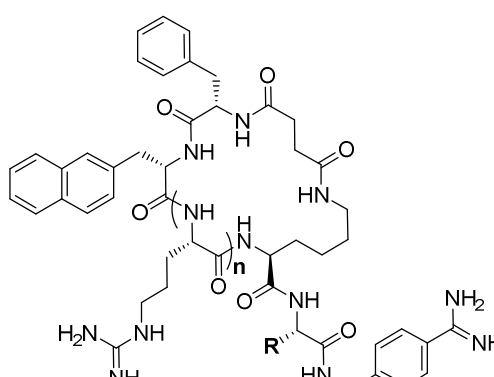
3.2.2.1 Zyklische Inhibitoren und Referenzverbindungen

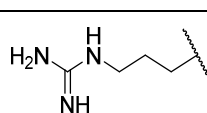
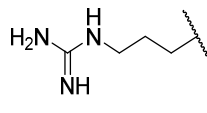
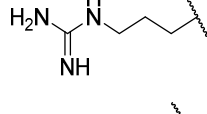
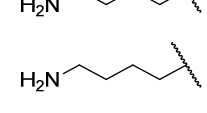
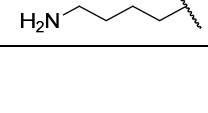
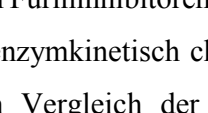
Die zyklischen Verbindungen (**Tabelle 4**) lassen sich problemlos nach der beschriebenen Methode auswerten, hemmen Furin also nach dem klassischen kompetitiven Inhibitionsmechanismus. Die im pikomolaren Bereich liegenden K_i -Werte der Arg-reichen Verbindungen mit 4-Amba in P1-Position sind nicht überraschend. Einige der Inhibitoren (**15**, **16** und **18**) zeigten sogar unter klassischen Bedingungen eine zu starke Hemmung, sodass diese unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen werden mussten. Die Verbindungen mit einem Arginin in Position P2 sind wie erwartet etwas bessere Inhibitoren als die analogen Lys-Derivate. Es ist bekannt, dass der Austausch des Arginins durch ein Lysin in dieser Position den K_i -Wert minimal (etwa um den Faktor 2) verschlechtert (Becker et al., 2011; Becker et al., 2010).

Die Hemmwirkung innerhalb dieser Serie wird durch die Anzahl der unterschiedlich vielen Arg-Reste im Zyklus beeinflusst. Die Ringsegmente mit drei Arg-Resten weisen die vergleichsweise schlechteste Furinhemmung auf (Verbindungen **14** und **17**), gefolgt von den Derivaten mit fünf Argininen (**16** und **19**). Als bester erwies sich der Zyklus mit vier Argininen in den Verbindungen **15** und **18**. Dieses Ergebnis könnte von Vorteil sein, da die Ringstrukturen aus vier Argininen entsprechend der Daten aus der Literatur die beste Membranpermeabilität besitzen sollen (Qian et al., 2013), was auch der eigentliche Grund für die Synthese dieser Inhibitorserie war. Es ist bekannt, dass *N*-terminal verlängerte lineare Furininhibitoren mit Argininen in Positionen P4, P5 und P6 Hemmkonstanten im niedrigen zweistellig pikomolaren Bereich haben (Hardes et al.,

2017). Die Ringstruktur mit den drei Arg-Resten, die formal den Resten P4, P5 und P5 entsprechen, weist möglicherweise eine vergleichsweise hohe Spannung auf, die die normale substratanaloge Bindung negativ beeinflussen könnte. Die Verlängerung der Struktur um ein Arginin macht den Ring flexibler und verbessert die Hemmwirkung. Jedoch bewirkte eine weitere Verlängerung durch einen fünften Arg-Rest im Ring eine Abnahme der Hemmwirkung, die bei den Verbindungen mit Arg in P2-Position (**16** im Vergleich zu **15**) stärker ausgeprägt ist als bei den analogen Lys-Verbindungen (**19** im Vergleich zu **18**).

Tabelle 4: Strukturen und Hemmwirkung zyklischer Furininhibitoren.



Nr.	R	n	K_i (pM)	Messbedingung
14		3	378±98	klassisch
15		4	53.8±5.9	<i>tight-binding</i>
16		5	146±32	<i>tight-binding</i>
17		3	618±2	klassisch
18		4	136±20	<i>tight-binding</i>
19		5	154±47	klassisch

Neben den zyklischen Furininhibitoren wurden auch die zyklischen (**20-22**) und linearen (**23-25**) Referenzverbindungen enzymkinetisch charakterisiert, die nur aus Arg-Resten aufgebaut wurden (**Tabelle 5**). Durch den Vergleich der Hemmwirkungen konnte bewiesen werden, dass die Inhibitoren mit 4-Amba in P1-Position (**Tabelle 4**) Furin deutlich stärker hemmen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass der 4-Amba-Rest in den zyklischen Verbindungen tatsächlich spezifisch in die S1-Tasche bindet: Die *head-to-tail* zyklisierten Oligoarginine sind zwar effektive Inhibitoren

mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich, sie erreichen aber bei Weitem nicht die Wirksamkeit der pikomolaren spezifischen Furininhibitoren.

Tabelle 5: Furinhemmung durch lineare und zyklisierte Oligoarginin-Derivate.

Nr.	Sequenz	K_i (nM)
20	cyclo(Arg) ₆	110.4±1.0
21	cyclo(Arg) ₈	22.7±0.5
22	cyclo(Arg) ₁₀	27.8±1.2
23	H-(Arg) ₆ -OH	9.4±2.3
24	H-(Arg) ₈ -OH	6.0±0.4
25	H-(Arg) ₁₀ -OH	9.3±1.2

Die linearen Oligoarginine (**23-25**) sind bessere Furininhibitoren im Vergleich zu den entsprechenden zyklischen Derivaten (**20-22**). Dieser Effekt lässt sich wieder mit der Ringspannung erklären: Die linearen Verbindungen sind sterisch flexibler, dadurch wird die Bindung an das Enzym erleichtert. Das Hexaarginin **23** und das Decaarginin **25** unterscheiden sich in der Hemmwirkung praktisch nicht (K_i -Wert etwa 9 nM). Interessanterweise ist das Octaarginin **24** mit einer Hemmkonstante von 6 nM etwas affiner. Die K_i -Werte des Hexa- und Octa-Arg-Derivats weichen trotz ähnlicher Messbedingungen von den in der Literatur beschriebenen Werten ab (Hexa-Arg-OH: K_i = 114 nM, Octa-Arg-OH: K_i = 61 nM) (Cameron et al., 2000) und hemmen unter unseren Bedingungen Furin deutlich stärker.

Der schwächste Inhibitor unter den zyklischen Derivaten ist wie erwartet das Hexaarginin **20**. Durch Aufweitung des Zyklus bei Verbindungen **21** und **22** wird die Ringspannung und dadurch auch der K_i -Wert gesenkt. Erwähnenswert ist hier auch, dass das zyklische Decaarginin **22** nicht potenter als das Octaarginin **21** ist, sondern sogar marginal schlechter.

3.2.2.2 C-terminal verlängerte Peptidderivate

Mit allen bisher hergestellten Inhibitoren in unserem Arbeitskreis wurden nur die ungestrichenen Bindetaschen des Furin adressiert. Homologiemodelle aller basischen PCs lassen vermuten, dass es in diesem Bereich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen PCs gibt (Henrich et al., 2005). Daher wurde eine Serie mit C-terminal verlängerten Inhibitoren hergestellt, um die gestrichenen Bindetaschen zu adressieren.

All diese Derivate (**Tabelle 6**) verhalten sich bei der enzymkinetischen Auswertung wie klassische kompetitive Inhibitoren. Ihre K_i -Werte konnten nach der oben beschriebenen Methode bestimmt werden.

Tabelle 6: C-terminal verlängerte Peptidderivate und ihre Furinhemmung.

Nr.	Sequenz	K_i (μ M)
26	Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Pro-NH ₂	4.45±0.47
27	Phac-Arg-Val-Arg-Arg-Pro-NH ₂	3.88±0.58
28	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH ₂	0.66±0.08
29	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH ₂	2.40±0.16
30	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH ₂	1.30±0.04
31	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn ¹ -Val-NH ₂	0.77±0.04
32	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH ₂	4.42±0.48
33	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH ₂	5.52±0.41
34	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH ₂	9.06±0.07
35	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn ¹ -Val-NH ₂	5.62±0.26
36	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Gly-Val-NH ₂	0.91±0.05
37	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Lys-Gly-Val-NH ₂	0.057±0.006
38	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Gly-Val-NH ₂	0.018±0.001
39	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Ser-Val-NH ₂	0.56±0.08
40	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-3-AMe-Phac-Val-NH ₂	0.78±0.08
41	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-AMe-Phac-Val-NH ₂	0.92±0.04
42	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-Ser-NH ₂	0.78±0.004
43²	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-NH ₂	0.026±0.003
44²	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-OH	0.025±0.001
45²	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-NH ₂	2.31±0.47
46²	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-OH	6.46±2.20

¹rOrn = *reversed* Ornithin; diese Aminosäure ist über ihre Seitenkette in das Peptidrückgrat eingebaut

²C-terminale Aminosäure = P1-Rest

Die zwei Inhibitoren mit neutralem P5-Rest **26** und **27** enthalten Prolinamid in Position P1'. Die meisten Serinproteasen spalten die Amidbindung *N*-terminal eines Prolinrestes nur sehr langsam (Stone and Maraganore, 1992) oder gar nicht. Dieses Prinzip wurde bei der Entwicklung der Hiruloge (von Hirudin abgeleitete spezifische Thrombininhibitoren, z.B. Bivalirudin) angewendet (Maraganore et al., 1990). Da Furin auch eine Serinprotease ist, sollten Peptide mit Pro in

P1'-Position inhibitorisch wirken. Die Verbindungen **26** und **27** zeigen mit K_i -Werten im mikromolaren Bereich eine drastisch reduzierte Furinhemmung im Vergleich zu den analogen subnanomolaren Inhibitoren mit 4-Amba in P1-Position **1** und **2** (**Abbildung 10**, S. 20). Dabei ist das Derivat **26** mit Valin als P3-Rest überraschenderweise etwas wirksamer als das entsprechende *tert*-Leucin-Derivat **27**. Bei allen anderen vorher beschriebenen Inhibitoren mit 4-Amba als P1-Rest sind je nach Grundstruktur die Tle-Derivate immer um den Faktor 1.5 bis 4 besser als die analogen Val-Verbindungen (Hardes et al., 2015; Hardes et al., 2017). Aus diesem Grund wurde für alle anderen Derivate in dieser Serie Tle in P3 eingebaut. Auch der neutrale P5-Rest wurde bei den weiteren Synthesen durch basische Reste ersetzt, da diese bekannterweise die Hemmwirkung substratanaloger Inhibitoren deutlich verstärkt (Becker et al., 2012; Hardes et al., 2015; Hardes et al., 2017). Alternativ wurde zur Verhinderung der Spaltung zwischen den P1- und P1'-Resten bei den Verbindungen **28-30** die ungewöhnliche Aminosäure 5-Ava als *spacer* zur Verknüpfung mit dem P2'-Rest eingebaut. Diese Aminosäure hat mit sechs Atomen in der Kette genau die Länge eines Dipeptids und sollte deswegen als Ersatz des spaltbaren P1-P1'-Segments geeignet sein. Als P2'-Reste wurden Val, Ala und Leu, jeweils als Amid, verwendet. Substrate mit diesen Aminosäuren in Position P2' werden durch Furin bevorzugt gespalten, wobei unter diesen drei Aminosäuren die höchste Präferenz für Val und die niedrigste für Leu vorliegt (Rawlings et al., 2014). Der wirksamste dieser drei Inhibitoren ist die Verbindung **28** mit einem K_i -Wert von etwa 0.7 μ M. Dieser ist jedoch über 100 000-mal schwächer als die Hemmkonstante der Referenzverbindung **4** mit 4-Amba in Position P1. Das P2'-Leu-Derivat **30** ist ein etwas wirksamer Furininhibitor als das P2'-Ala-Derivat **29**.

Bei den analogen Verbindungen **32-34** wurde 4-AMe-Phac anstelle von 4-GMe-Phac als P5-Rest eingebaut. Dies führte zu einer Verschlechterung der jeweiligen K_i -Werte etwa um den Faktor 7 – diese Tendenz war bereits aus früheren Arbeiten bekannt (Becker et al., 2012; Hardes et al., 2015; Hardes et al., 2017). Unter diesen drei Verbindungen hat das P2'-Val-Derivat die stärkste und das P2'-Leu-Derivat die schwächste Hemmwirkung.

Bei den Verbindungen **31** und **35** wurde ein Ornithin als P1-P1'-*spacer* verwendet, indem statt der α -Aminogruppe dessen Aminogruppe in der Seitenkette in das Peptidrückgrat eingebaut wurde. Auf diese Weise wurde das P1-P1'-Segment wieder durch einen genauso langen, aber unspaltbaren *linker* ersetzt, der im Gegensatz zum 5-Ava-Rest noch eine zusätzliche hydrophile Gruppe trägt. Der Inhibitor **31** mit dem *N*-terminalen Guanidin ist wie erwartet um den Faktor 7 besser als die analoge Amin-Verbindung **35**. Beide Ornithin-Derivate sind jedoch marginal schwächer wirksam als die analogen Inhibitoren mit 5-Ava. Die freie α -Aminogruppe des Ornithins, die formal gesehen die Rolle einer P1'-Seitenkette übernimmt, führt zu keinem Affinitätsgewinn. Natürlich könnte

diese Position weiter substituiert werden, denkbar wäre auch der Einbau eines D-Ornithins. Da diese Derivate jedoch relativ wenig wirksam waren, wurde darauf bisher verzichtet.

Bei den Verbindungen **40** und **41** wurden 3-AMe-Phac oder 4-AMe-Phac als *spacer* verwendet. Mit K_i -Werten von 0.8 und 0.9 μM hemmen diese Inhibitoren Furin nur marginal schwächer als der Inhibitor **28** mit dem 5-Ava-*linker* ($K_i = 0.66 \mu\text{M}$).

Durch eine C-terminale Verlängerung um noch eine weitere Aminosäure (formal in P3'-Position) wurde versucht, die Hemmwirkung zu erhöhen. Als P3'-Rest wurde aufgrund der Substratpräferenz Serin eingebaut. Die Hemmwirkung des Inhibitors **42** (0.78 μM) konnte allerdings im Vergleich zum Hemmstoff **28** ($K_i = 0.66 \mu\text{M}$) nicht verbessert werden. Prinzipiell stimmt das mit früheren Beobachtung überein, dass durch Adressierung der gestrichenen Seite des Furin keine Erhöhung der Hemmwirkung erreicht werden kann (Angliker, 1995). Aus der Kristallstruktur des Furin ist ersichtlich, dass sich alle spezifitätsbestimmenden Regionen auf der Enzymoberfläche N-terminal der Spaltstelle befinden. Dies deutet darauf hin, dass das C-terminale Substratsegment nur locker bindet und nach der Hydrolyse schnell dissoziiert (Dahms et al., 2016). Die Substratspezifität bei Serinproteasen ist in der Regel N-terminal von der Spaltstelle stärker ausgeprägt. Folglich lassen sich diese Enzyme meistens stärker durch Inhibitoren hemmen, die die ungestrichene Seite adressieren. Jedoch ist bisher unklar, ob der Einbau des 5-Ava-Restes oder des über die Seitenkette gekuppelten Ornithins überhaupt dazu führt, dass deren Carbonylgruppen die Position der Carbonylgruppe eines P1'-Restes einnehmen. Beide Reste sind sehr flexibel, daher könnte das C-terminale Segment auch in eine andere Richtung orientiert sein. Um rigidere Peptide zu erhalten, wurde parallel versucht, an Stelle der zur Stabilisierung eingebauten Reste 5-Ava und Orn gewöhnliche Dipeptidstrukturen einzubauen, initial jedoch ohne basische P1-Seitenkette. In der Verbindung **36** wurde daher als P1-P1'-Segment Gly-Gly eingebaut. Im Vergleich zur analogen Verbindung **28** mit dem 5-Ava-Rest ($K_i = 0.7 \mu\text{M}$) konnte die Furinhemmung durch den Inhibitor **36** nicht verbessert werden ($K_i = 0.9 \mu\text{M}$).

In einer früheren Arbeit wurde berichtet, dass durch Modifizierungen des natürlich vorkommenden monozyklischen SFTI wirksame Furininhibitoren entwickelt werden konnten (Fittler et al., 2015) (**Kapitel 1.3.3.2**). Derivate mit Arg oder Lys in P1-Position zeigten die beste Hemmwirkung, wobei die Verbindung mit Lys überraschenderweise zu einer stärkeren Inhibierung als das Arg-Derivat führte. Daher wurden die Verbindungen **37** und **38** mit Lys oder Arg als P1-Rest hergestellt, als P1'-Rest diente wieder ein Glycin ohne sperrige Seitenkette. Diese Substitutionen lieferten in der Tat einige der wirksamsten Inhibitoren innerhalb dieser Serie mit K_i -Werten von ca. 60 bzw. 20 nM. Im Gegensatz zu den SFTI-Derivaten war jedoch das P1-Arg-Derivat **38** der bessere Inhibitor.

Da Arg und Lys als P1-Reste nicht nur in Furininhibitoren, sondern auch in Furinsubstraten vorkommen (Krysan et al., 1999), liegt der Gedanke nahe, dass diese Peptidderivate durch Furin möglicherweise spaltbar sind. Selbst wenn diese Verbindungen als Substrate fungieren würden, würden sie auf die Umsetzung eines zweiten zur Messung verwendeten fluorogenen Substrats inhibitorisch wirken, da sie beide miteinander im aktiven Zentrum konkurrieren würden. Die vermeintliche Spaltung kann jedoch nicht im Rahmen einer einfachen Substratuntersuchung (**Kapitel 3.2.1**) überprüft werden, da die Peptidderivate keinen abspaltbaren Fluorophor wie AMC tragen. Aus diesem Grund wurden HPLC-Untersuchungen durchgeführt (**Kapitel 3.3**). Als Referenzverbindungen für die HPLC-Tests wurden die kürzeren Derivate **43-46** mit C-terminalem Arg oder Gly in P1-Position hergestellt, jeweils als Amid oder als freie Carbonsäure.

Die HPLC-Stabilitätsprüfungen ergaben, dass die Verbindung **38** im Rahmen der üblichen Dauer enzymkinetischer Messungen von ca. 30 min zu etwa 20 % durch Furin gespalten wird. Das ist zwar keine quantitative Umsetzung, dafür erfolgt sie jedoch viel schneller als die Spaltung des Substrates **7**, die mittels HPLC innerhalb von 30 min überhaupt nicht detektierbar ist. Möglicherweise führt der voluminöse AMC-Rest in P1'-Position zu einem sterischen Konflikt, sodass das einfache Peptid **38** affiner bindet und schneller gespalten wird. Die Referenzverbindung **44** hat die gleiche HPLC-Retentionszeit wie das UV-aktive Produkt der Umsetzung des Peptids **38**. Demzufolge steht ohne Zweifel fest, dass die Spaltung hinter dem entsprechenden P1-Arg-Rest erfolgt. Das etwas hydrophilere Amid-Derivat **43** wird durch Furin innerhalb von 30 min auch zu etwa 20 % gespalten. Sein Abspaltprodukt hat wiederum die gleiche Retentionszeit wie die Verbindung **44**.

Da Glycin im Gegensatz zu Arginin und Lysin kein passender P1-Substituent für Furinsubstrate ist, wird das Derivat **45** mit einem Glycinamid in P1-Position durch Furin nicht gespalten (**Kapitel 3.3**). Das könnte erklären, warum dieser Inhibitor fast um den Faktor 3 besser als das analoge Carbonsäurederivat **46** ist. Das Amid trägt keine zusätzliche negative Ladung und bindet deswegen affiner als die Carbonsäure an Furin, während die Carboxylatstruktur des Inhibitors **46** sehr wahrscheinlich von der nukleophilen Seitenkette des Ser368 im aktiven Zentrum des Furin abgestoßen wird. Sehr wahrscheinlich wird die Verbindung **36** mit P1-Gly auch nicht gespalten.

Der Versuch, durch den Einbau verschiedener stabiler oder auch spaltbarer *spacer* oder Dipeptide und C-terminale Verlängerung Bindungstaschen der gestrichenen Seite des Enzyms zu adressieren, führte im Vergleich zu den zuvor beschriebenen 4-Amba-Derivaten zu einem drastischen Abfall der Hemmwirkung. Selbst die besten Inhibitoren mit Hemmkonstanten von etwa 20 nM konnten die Wirksamkeit des Benzamidin-Derivates **4** bei Weitem nicht erreichen. Aus diesem Grund wurde diese Idee zur Entwicklung neuer Furininhibitoren bisher nicht weiter verfolgt.

3.2.2.3 Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette

Die Verbindungen **47-49** (Tabelle 7) sind weitere Derivate mit C-terminalem 4-Amba-Rest. Aus Publikationen einer kanadischen Arbeitsgruppe war das Tetraleucin-Derivat **48** (Kwiatkowska et al., 2016) bereits bekannt und wurde als Referenzverbindung hergestellt. In diesem Fall wurde eine Sequenz mit mehreren Leu-Resten N-terminal an ein P4-P1-Segment mit C-terminalem 4-Amba-Rest gekuppelt. Angeblich soll diese hydrophobe Tetraleucin-Sequenz die Wirksamkeit in Zellkultur und die Verträglichkeit *in vivo* verbessern. Im Falle des Inhibitors **49** wurde dieses Tetra-Leu-Segment verschoben, d.h. an die Seitenkette eines Lysins in P3-Position gekuppelt. Dadurch kann der basische 4-GMe-Phac-Rest in P5-Position beibehalten werden. Im Falle des Inhibitors **47** wurde an die P3-Lys-Seitenkette über einen Succinyl-*spacer* ein zweiter 4-Amba-Rest gekuppelt.

Tabelle 7: Furininhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette. Die Sequenzen in Klammern stellen Verlängerungen in der Seitenkette des P3-Lys dar; Ac = Acetyl-Rest.

Nr.	Sequenz	K_i (pM)	Messbedingung
47	4-GMe-Phac-Arg-Lys(Suc-4-Amba)-Arg-4-Amba	34.5±1.7	<i>tight-binding</i>
48	Ac-DLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-4-Amba	449±34	klassisch
49	4-GMe-Phac-Arg-Lys(Gly-Leu-Leu-Leu-DLeu-Ac)-Lys-4-Amba	381±9	klassisch

Die drei Verbindungen hemmen Furin nach einem klassischen kompetitiven Hemmmechanismus. Inhibitor **47** hemmt Furin sogar so stark, dass dieser unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen werden musste. Trotzdem ist dieses Derivat mit einem K_i -Wert von 35 pM etwa sechsmal weniger wirksam als die Verbindung **4**. Die Verlängerung in P3-Position unter Einbau eines zweiten Amba-Restes hat keinen Vorteil gegenüber Tle.

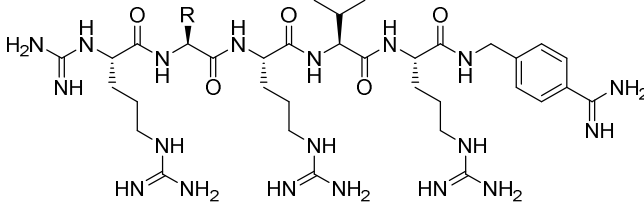
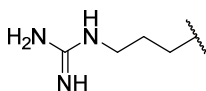

Für die nachsynthetisierte Verbindung **48** wurde ein K_i -Wert von 449 pM bestimmt (Harges et al., 2017). Dieser Wert unterscheidet sich überraschenderweise sehr deutlich von dem früher publizierten K_i -Wert (9.8 nM), obwohl es nur marginale Unterschiede zwischen unseren Messmethoden und diesen der kanadischen Gruppe gibt. Die Ursachen für die Unterschiede in den K_i -Werten sind unklar. Ein denkbarer Grund könnte sein, dass in unserem Arbeitskreis Furin genutzt wird, das in CHO-Zellen produziert wurde, während die kanadische Gruppe ein leicht verändertes Furinkonstrukt nutzt, das in Insektenzellen hergestellt wurde. Wenn die Tetraleucin-Sequenz an die Seitenkette der P3-Position gekuppelt wird und als Hauptkette das Rückgrat des wirksamen Inhibitors **4** verwendet wird, resultiert ein marginal besserer K_i -Wert von 381 pM (Verbindung **49**). Die Hemmwirkung beider P2-Lys-Derivate kann durch Austausch gegen ein Arg weiter gesteigert

werden (Hardes et al., 2017). Das primäre Ziel dieser Synthesen war jedoch nicht die Steigerung der Furinhemmung *in vitro*, sondern die Verbesserung der Wirksamkeit in Zellkulturuntersuchungen und gegebenenfalls der Verträglichkeit *in vivo*. Ob das Ziel erreicht werden konnte, muss im Rahmen weiterer Studien untersucht werden.

3.2.2.4 Derivate mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe

Die Verbindungen **50** und **51** (Tabelle 8) sind Beispiele für Inhibitoren, die sehr affin an Furin binden und sich nur unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen lassen.

Tabelle 8: Furininhibitoren mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe und Arg oder Ala in P5-Position.

		
Nr.	R	K_i (pM)
50		6.2±1.0
51		11.9±3.4

Durch die Überführung der α -Aminogruppe des *N*-terminalen P6-Arginins in ein Guanidin (Verbindung **50**) wurde die Hemmkonstante um den Faktor 5 verbessert: Die analoge Verbindung mit *N*-terminaler Aminogruppe besitzt einen K_i -Wert von 34 pM (Hardes et al., 2017). Der Verlust einer stark basischen Funktion beim Inhibitor **51** mit einem neutralen Ala-Rest in P5-Position führt nur zu einem moderaten Affinitätsverlust (Faktor 2).

3.2.2.5 *C*-terminal verkürzte Peptidderivate

Die enzymkinetische Charakterisierung der *C*-terminal verlängerten Derivate zeigte, dass durch eine Adressierung der gestrichenen Bindungstaschen kein zusätzlicher Affinitätsgewinn erreicht werden konnte. Die Inhibitoren mit einem P3'-Rest sind nicht wirksamer als die kürzeren Derivate. Die Bindung an Furin wird offenbar hauptsächlich durch das bewährte *N*-terminale Segment des Inhibitors **4** vermittelt. Daher sollte geprüft werden, wie groß der Einfluss der einzelnen P5- bis P1-Reste auf die Furinhemmung ist.

Auf der Suche nach dieser Antwort wurden einige Derivate hergestellt, die vom C-Terminus aus schrittweise jeweils um einen Rest verkürzt wurden (**Tabelle 9**). Zu Beginn wurde die Synthese auf C-terminale Amidderivate beschränkt, da diese bequem am Rink-Amid-Harz herstellbar sind. Außerdem tragen sie im Gegensatz zu den Carbonsäurederivaten keine zusätzliche negative Ladung und sollten dadurch affiner an die saure Oberfläche des Furin binden (**52-54**).

Tabelle 9: C-terminal verkürzte Peptidderivate und ihre Furinhemmung.

Nr.	Sequenz	K_i (μM)	IC_{50} (μM)
52	4-GMe-Phac-Arg-NH ₂	n.b.	10.7 \pm 0.4
53	4-GMe-Phac-Arg-Tle-NH ₂	n.b.	55.6 \pm 4.7
54	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH ₂	2.2 \pm 0.5	8.3 \pm 0.8
55	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-OH	12.8 \pm 1.6	53.0 \pm 0.1

Der Versuch, diese Inhibitoren unter den klassischen Bedingungen enzymkinetisch zu charakterisieren, lieferte Ergebnisse, die zuerst als Messungenauigkeiten gedeutet wurden. Die Werte ließen sich nicht an die Gleichung für eine klassische reversible kompetitive Hemmung anpassen (**Abbildung 22A**). Bei wiederholten genaueren Untersuchungen wurde jedoch klar, dass dieses Verhalten kein Artefakt ist, sondern bei allen Messungen auftritt. In der Dixon-Auftragung ist eine regelmäßige parabolische Abweichung zu sehen (**Abbildung 22B**). Da ein klassischer kompetitiver Inhibitor in der Dixon-Auftragung Geraden und keine gekrümmten Linien liefert, liegt die Vermutung nahe, dass diese Inhibitoren einen anderen Bindungsmodus besitzen.

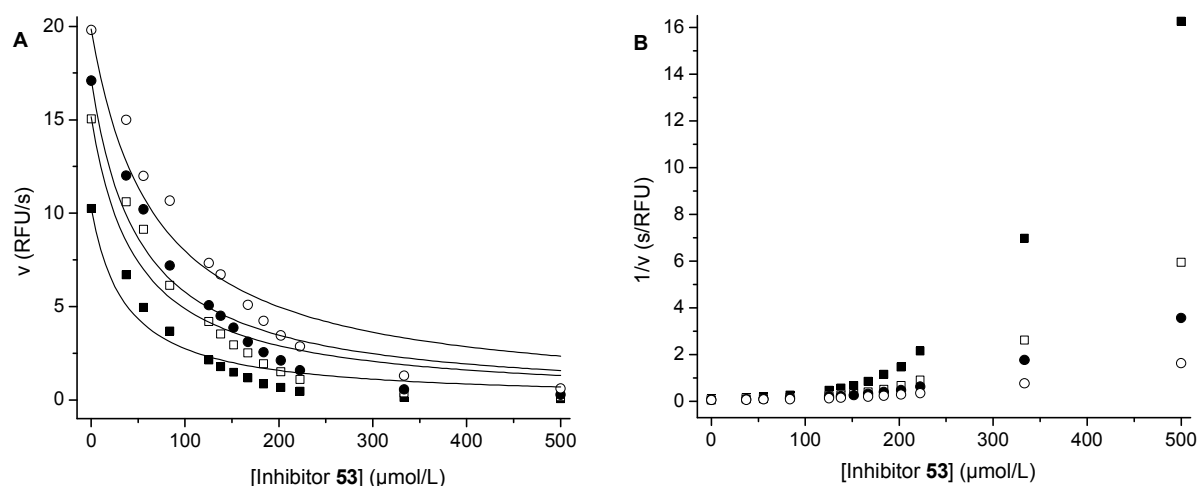


Abbildung 22: Enzymkinetische Charakterisierung des Furininhibitors **53**. **A:** Anpassung der Messdaten an die Gleichung für klassische kompetitive reversible Hemmung (**Gleichung 10**, S. 193): Die Messdaten passen nicht zu den berechneten Kurven; **B:** Dixon-Auftragung der identischen Messdaten: Eine lineare Anpassung der Messdaten ist nicht möglich. Die Hemmung wurde bei variierenden Inhibitorkonzentrationen und jeweils vier Konzentrationen des Substrates **7** gemessen: 5 (■), 12.5 (□), 20 (●) und 50 (○) $\mu\text{mol/L}$. Die Furinkonzentration betrug 0.95 nmol/L .

Diese Abweichung erschwerte die enzymkinetische Charakterisierung mehrerer neuer Inhibitoren. Bislang wurde der K_i -Wert als einziger Parameter zur Beschreibung der Hemmwirkung verwendet. Ein K_i -Wert lässt sich jedoch nur dann ausrechnen, wenn der Hemmmechanismus bekannt ist, da die verschiedenen Mechanismen durch unterschiedliche mathematische Modelle beschrieben werden. Ein bei Weitem nicht so aussagekräftiger Parameter ist die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), die unabhängig vom Bindungsmodus und daher in der Regel immer bestimmbar ist. Dieser Wert liefert lediglich die Information, bei welcher Konzentration ein Inhibitor die maximale Enzymaktivität halbiert. Im Gegensatz zum K_i -Wert ist der IC_{50} -Wert kein direkter Indikator für die Bindungsaffinität des Inhibitors. Dazu kommt der weitere Nachteil, dass der IC_{50} -Wert sowohl von der Art als auch von der Konzentration des bei der Messung verwendeten Substrates abhängig ist. Trotz dieser Nachteile ist die IC_{50} -Bestimmung die einzige Möglichkeit, Inhibitoren mit unbekanntem Hemmmechanismus zu charakterisieren und vor allem untereinander zu vergleichen.

Zur Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten IC_{50} -Werte wurden alle Messungen unter identischen Bedingungen bei einer einzigen Konzentration des Substrats **7** von 12.5 $\mu\text{mol/L}$ im Messansatz durchgeführt. Durch Anpassung der Messdaten an **Gleichung 11** (S. 194) wurden die IC_{50} -Werte berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die längste Sequenz ohne den P1-Rest (P5-P2, Verbindung **54**) wie erwartet die stärkste Hemmwirkung aufweist (IC_{50} etwa 8 μM), obwohl überraschenderweise das sehr kurze P5-P4-Segment **52** fast genauso wirksam ist ($IC_{50} = 10.7 \mu\text{M}$). Unerwarteterweise ist das P5-P3-Segment **53** mit einem IC_{50} -Wert von 56 μM der schwächste Inhibitor. Normalerweise sollte ein zusätzlicher P3-Rest die Hemmwirkung deutlich verbessern, da von dessen Rückgrat zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Gly255 des Furin ausgebildet werden. Das lässt vermuten, dass zumindest einige dieser Verbindungen Furin nicht unbedingt entsprechend des aus mehreren Kristallstrukturen bekannten klassischen Bindungsmodus inhibieren.

Allerdings muss noch erwähnt werden, dass die Verbindung **54** eine nahezu lineare Abhängigkeit in der Dixon-Auftragung zeigt. Dementsprechend wurde auch ein K_i -Wert durch Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung berechnet. Die Anpassung erfolgte in akzeptabler Qualität, sodass die Verbindung **54** als ein klassischer kompetitiver Inhibitor betrachtet werden kann. Dafür spricht auch die Tatsache, dass durch Umrechnung des IC_{50} -Wertes mit der **Gleichung 12** (S. 194) für klassische kompetitive Inhibitoren (Cheng and Prusoff, 1973; Naqui, 1983) einen nahezu identischen K_i -Wert von 2.4 μM erhalten wird. Da jedoch der Bindungsmodus der zwei kürzeren Peptide unklar ist, kann deren Bindungsaffinität nicht direkt mit der Verbindung **54** verglichen werden. Es ist letztlich unklar, wie sich diese Peptidderivate an Furin anlagern und welche Bindetaschen überhaupt adressiert werden. Dementsprechend bleibt auch die

Frage offen, warum die Verbindung **53** mit dem neutralen Tle-Rest am C-Terminus die Furinaktivität um den Faktor 5 bzw. 7 schwächer hemmt als das kürzere Derivat **52** und das längere Peptid **54**, die C-terminal einen zusätzlichen basischen Arg-Rest besitzen.

Für den Inhibitor **54** wurde zwar ein K_i -Wert nach der Gleichung für kompetitive Hemmung bestimmt, die graphische Anpassung der Messwerte an diese Gleichung funktionierte jedoch nicht ganz so perfekt wie im Falle der C-terminal verlängerten Derivate. Im Falle des P5-P1-Inhibitors **44** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-OH) wurden keinerlei Abweichungen der experimentell bestimmten Messdaten von den berechneten Kurven festgestellt. Daraus lässt sich schließen, dass der 4-GMe-Phac-Rest, der aufgrund der stark ausgeprägten Interaktionen mit der Furinoberfläche im Vergleich zum neutralen Phac-Rest die Furinhemmung um den Faktor 30 bis 40 verbessert, nicht in der Lage ist, das Peptidrückgrat im erwarteten Bindungsmodus zu halten bzw. ein C-terminal verkürztes Segment in die gewünschte Position zu zwingen. Offenbar wird dafür ein P1-Rest benötigt (wie z.B. beim Inhibitor **44**).

Ein weiterer alternativer Bindungsmodus für die Verbindung **54** könnte die Ausrichtung des P2-Arg-Restes in der S1-Bindetasche sein, obwohl dann kein zweiter direkt benachbarter basischer Rest für die Besetzung der S2-Tasche vorhanden wäre. Jedoch werden manche natürliche Furinsubstrate (z.B. das Shiga-Toxin) auch hinter einzelnen basischen Resten gespalten (Rockwell et al., 2002). Denkbar wäre auch noch, dass der hypothetische P4-Arg-Rest des Derivats **52** in die S1-Bindetasche gerichtet ist und der 4-GMe-Phac-Rest die S2-Tasche adressiert. Dies könnte auch erklären, warum das Derivat **53** mit nichtbasischem Tle-Amid am C-Terminus so viel schlechter hemmt. Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurde der Inhibitor **54** mit Furin inkubiert und anschließend auf Abspaltprodukte mittels HPLC untersucht (siehe **Kapitel 3.3**). Wenn das C-terminale Argininamid tatsächlich in der S1-Tasche binden würde, müsste das Derivat **54** zur analogen Carbonsäure-Verbindung umgesetzt werden, die als Referenzverbindung hergestellt wurde (**55**). Die HPLC-Untersuchung nach einstündiger Inkubation des Inhibitors **54** mit Furin ergab jedoch, dass die Verbindung absolut stabil ist und nicht umgesetzt wird. Der vorgeschlagene Bindungsmodus konnte dadurch ausgeschlossen werden. Für das analoge Carbonsäurederivat **55** wurde eine ca. sechsfach schwächere Furinhemmung festgestellt. Diese Verbindung zeigt auch eine minimale parabolische Abweichung in der Dixon-Auftragung, ein K_i -Wert lässt sich trotzdem relativ gut mit der bekannten Gleichung ausrechnen.

Die Adressierung der gestrichenen Seite trägt zwar nicht zur Hemmwirkung bei, dafür aber zur Erhaltung des klassisch-kompetitiven Bindungsmodus. Alle C-terminal verlängerten Derivate zeigen ein lineares Verhalten in der Dixon-Auftragung. Der P2'-Rest könnte in Kombination mit dem affinen 4-GMe-Phac-Substituenten in P5-Stelle die erwartete Anlagerung an Furin bewirken,

selbst wenn in der Inhibitorstruktur auf die Seitenketten und die Amidbindung zwischen den P1- und P1'-Resten komplett verzichtet wird, z.B. beim Inhibitor **28** (**Tabelle 6**, S. 68). Die HPLC-Stabilitätsprüfung dieses Inhibitors zeigte keine Spaltung durch Furin (**Kapitel 3.3**). Dieses Ergebnis könnte ein indirekter Beweis für den vorhergesagten Bindungsmodus des Inhibitors **28** sein: Wenn der unspaltbare P1-P1'-*linker* tatsächlich genau über den Bereich der S1- und S1'-Taschen platziert ist, dann befindet sich im aktiven Zentrum keine spaltbare Peptidbindung.

3.2.2.6 Inhibitoren mit P1-Modifizierungen

Das Entfernen des P1-4-Amba-Restes aus Inhibitor **4** führte bei Verbindung **54** (**Tabelle 9**, S. 74) zu einer drastischen Reduktion der Bindungsaffinität um den Faktor 400 000. Auch die anderen Derivate ohne den P1-Amba-Rest, die dennoch die gestrichene Seite des Furin adressieren, weisen nur eine recht moderate Furininhibition mit K_i -Werten im dreistelligen nanomolaren Bereich auf. Offenbar ist bei diesen substratanalogen Strukturen ein basischer P1-Rest zur Aufrechterhaltung einer wirksamen Furinhemmung unerlässlich.

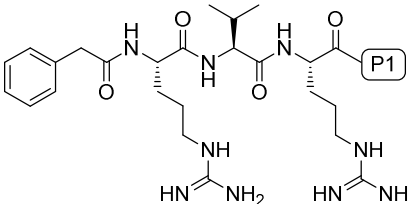
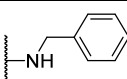
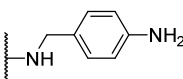
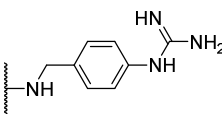
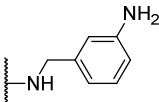
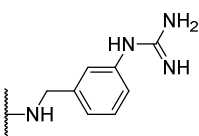
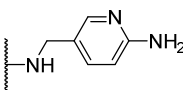
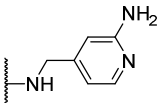
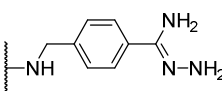
Während dieser Arbeiten wurde festgestellt, dass die Verbindung **4** in Mäusen relativ toxisch ist (**Kapitel 3.5**). Da auch aus der Literatur bekannt war, dass einige Benzamidin-Verbindungen Nebenwirkungen auslösen (Kaiser et al., 1987; Kwiatkowska et al., 2016; Peternel et al., 2006), sollte der stark basische 4-Amba-Rest durch schwächer basische P1-Bausteine ersetzt werden. Es wurde erwartet, dass durch den Austausch des P1-Amba-Restes die Furinhemmung abgeschwächt wird, dennoch sollte es prinzipiell möglich sein, auf diese Art und Weise neue Hemmstoffe mit nanomolaren Hemmkonstanten bei reduzierter Toxizität zu erhalten. Letztendlich muss ein Kompromiss zwischen ausreichender Bindungsaffinität, Wirksamkeit in Zellkulturtests und Verträglichkeit *in vivo* gefunden werden.

Bei der Synthese der ersten Inhibitorserie mit unterschiedlichen P1-Resten wurde das P5-P2-Segment der Referenzverbindung **1** (**Abbildung 10**, S. 20) mit Val in P3-Position und neutralem P5-Rest beibehalten (**Tabelle 10**). Die P1-Reste der besten Inhibitoren aus dieser Reihe wurden an das P5-P2-Segment der Verbindung **3** (**Abbildung 10**) mit dem wirksameren basischen P5-Rest gekuppelt (**Tabelle 11**). Ausgewählte Bausteine wurden letztendlich mit Tle als P3-Rest kombiniert (**Tabelle 12**).

Da bei allen Inhibitoren ein P5-P1-Segment vorhanden war, wurden sie als substratanaloge Inhibitoren angesehen, die an den S5-S1-Bereich des Furin binden. Es wurde also, genauso wie für die entsprechenden 4-Amba-Referenzverbindungen, von einer klassischen kompetitiven Inhibition ausgegangen. Interessanterweise trat aber bei mehreren P1-modifizierten Inhibitoren dasselbe

Verhalten auf, das bereits bei einigen C-terminal verkürzten Derivaten beschrieben wurde. Daher konnten für diese Verbindungen nur IC_{50} -Werte bestimmt werden. Damit alle Inhibitoren aus der Serie direkt miteinander verglichen werden können, wurden auch für die klassischen kompetitiven Inhibitoren zusätzlich die IC_{50} -Werte experimentell bestimmt. Bei bekanntem Hemmmechanismus lassen sich der K_i - und IC_{50} -Wert ineinander umrechnen. Im Falle der kompetitiven Hemmung geschieht diese Umrechnung mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng and Prusoff, 1973) (**Gleichung 12**, S. 194). Die Übereinstimmung der experimentell bestimmten mit den aus den IC_{50} -Werten berechneten K_i -Werten ist ein zusätzlicher Beweis für den klassischen kompetitiven Bindungsmodus der meisten Inhibitoren dieser Serie.

Tabelle 10: Furininhibitoren mit modifiziertem P1- und neutralem P5-Rest.

				
Nr.	P1	pK_a^1	K_i (nM)	IC_{50} (nM)
56		-	70 200±22 900	283 000±56 000
57		4.36	n.b.	96 400±21 700
58		10.40	890±350	3 160±180
59		4.27	n.b.	32.0±5.0
60		10.50	950±80	4 250±130
61		6.50	540±20	2 010±80
62		6.73	950±70	3 240±190
63		8.67	860±40	3 340±200

¹Berechnet für die acetylierten P1-Reste mit dem ChemAxon's pK_a plugin (<https://chemicalize.com/welcome>)

Die Verbindung **56** (**Tabelle 10**) wurde als Referenzverbindung mit neutralen P5- und P1-Resten für künftige Toxizitätsstudien hergestellt. Mit einem K_i -Wert von 70 μM ist sie 100 000-mal schwächer als die Referenzverbindung **1** (**Abbildung 10**, S. 20) und somit ein ungeeigneter Furininhibitor. Dagegen könnten Benzylamide mit Substituenten unterschiedlicher Basizität eine akzeptable Alternative zum stark basischen 4-Amba-Rest ($\text{p}K_a = 11.48$) sein. Die Derivate mit aromatischen Guanidinen (**58** und **60**) und Aminopyridinen (**61** und **62**) in P1-Position sowie das aromatische Amidrazon-Derivat **63** zeigen trotz starker Unterschiede in der Basizität und ihrer sterischen Ansprüche eine sehr ähnliche Furinhemmung. Die *p*-substituierten Verbindungen sind zwar marginal besser als die entsprechenden *m*-Analoga, alle IC_{50} -Werte liegen aber etwa im selben Bereich zwischen 2 und 4 μM .

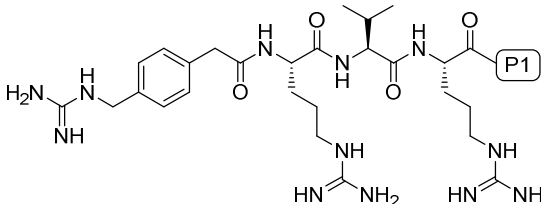
Dagegen unterscheiden sich die Anilin-Derivate (**57** und **59**) in ihrer Hemmwirkung drastisch von den restlichen Inhibitoren und auch untereinander, obwohl beide Isomere praktisch den gleichen $\text{p}K_a$ -Wert aufweisen. Das *p*-substituierte Anilin ist um den Faktor 30 schlechter, das *m*-substituierte Derivat um den Faktor 130 besser als das jeweils analoge aromatische Guanidin. Ein weiterer Unterschied liegt im Bindungsmodus: Die aromatischen Amine sind offenbar keine klassischen kompetitiven Inhibitoren, da die Auswertung ihrer Messwerte Parabeln statt Geraden in der Dixon-Auftragung liefert. Woran diese starke Diskrepanz zwischen den IC_{50} -Werten der beiden Positionsisomere liegt, ist unklar, da ihr exakter Bindungsmodus unbekannt ist.

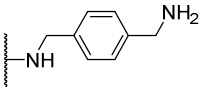
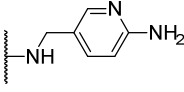
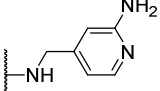
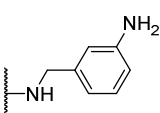
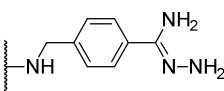
In einer zweiten Serie (**Tabelle 11**) wurden ausgewählte P1-Reste mit dem basischen 4-GMe-Phac-Rest kombiniert, um die Wirksamkeit der Inhibitoren zu verstärken. Als P1-Reste wurden beide Aminopyridine, das *m*-substituierte Anilin und das aromatische Amidrazon verwendet. Der schon bekannte Benzylamin-Rest (Becker et al., 2010) wurde ebenfalls an das Segment mit basischem P5-Rest gekuppelt.

Wie erwartet wurde die hemmende Wirkung der Derivate mit Aminopyridinen in P1-Position (**65** und **66**) durch den Einbau des basischen P5-Restes um den Faktor 100 verstärkt. Etwa im selben Bereich hemmt auch der Benzylamin-Inhibitor **64** trotz des deutlich höheren $\text{p}K_a$ -Wertes. Überraschenderweise hemmt der Amidrazon-Inhibitor **68** Furin lediglich um den Faktor 5 besser als das analoge Derivat mit neutralem P5-Rest, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Bindungsmodi. Im Gegensatz zum Derivat mit neutralem P5-Rest konnte für den Inhibitor **68** kein K_i -Wert bestimmt werden. Erstaunlicherweise wurde das *m*-substituierte Anilin in Kombination mit dem basischen P5-Rest (**67**) zu einem klassischen kompetitiven, dafür aber merklich schlechteren Inhibitor. Das analoge Derivat mit dem 4-AMe-Phac statt Guanidin in P5-Position (**69**, 4-AMe-Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid, nicht in der Tabelle abgebildet) inhibiert Furin

auch kompetitiv mit einem K_i -Wert von 633 nM. In diesem Fall reicht also auch eine schwächer basische Substitution des P5-Restes aus, um einen kompetitiven Bindungsmodus zu erzwingen.

Tabelle 11: Furininhibitoren mit modifiziertem P1- und basischem P5-Rest und Val in Position P3.



Nr.	P1	pK_a ¹	K_i (nM)	IC_{50} (nM)
64		9.28	3.47±0.15	12.9±0.4
65		6.50	3.73±0.25	13.0±1.1
66		6.73	8.32±0.20	31.8±3.7
67		4.27	142±9	550±30
68		8.67	n.b.	660±2

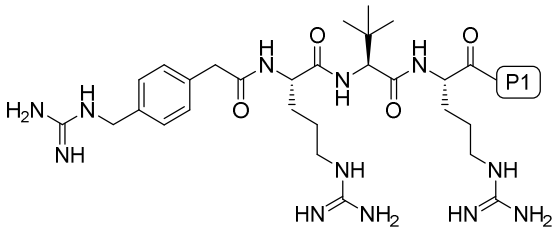
¹Berechnet für die acetylierten P1-Reste mit dem ChemAxon's *pK_a plugin* (<https://chemicalize.com/welcome>)

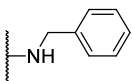
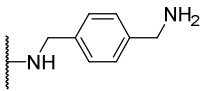
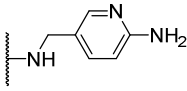
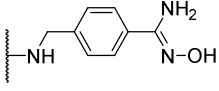
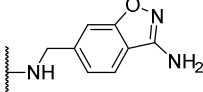
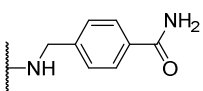
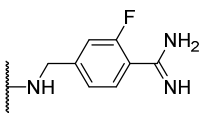
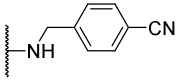
In die Synthesen der folgenden Serie (**Tabelle 12**) wurde das P5-P2-Segment der Verbindung **4** mit dem P3-Tle-Rest benutzt und mit verschiedenen P1-Resten kombiniert. Die Verbindung **70** wurde als Referenzverbindung für Toxizitätsstudien hergestellt. Weitere neutrale P1-Bausteine, die für eine wirksame Furinhemmung ungeeignet sind, dafür aber als Referenzverbindungen zur Untersuchung des unbekannten Bindungsmodus dienten, sind das Benzamid in der Verbindung **75** und das Benzonitril in der Verbindung **77**.

Die Bindungsaffinitäten des Benzylamin-Derivats **71** und des Inhibitors **72** mit *p*-Aminopyridin in P1-Position wurden wie erhofft durch den Einbau des P3-Tle-Restes etwa um den Faktor 1.4 bzw. 4.7 (Harden et al., 2015) stärker. Die K_i -Werte dieser Verbindungen liegen jeweils im nanomolaren (**71**) und subnanomolaren (**72**) Bereich. Der P1-Baustein der Verbindung **74**, der aus dem Faktor Xa-Inhibitor Razaxaban bekannt ist (Quan et al., 2005), ist formal ein bizyklisches nichtbasisches Benzamidin-Analogon. Obwohl dieser P1-Rest ähnliche räumliche Ansprüche wie

4-Amba oder das Fluor-substituierte 4-Amba (im Inhibitor **76**) aufweisen sollte, bindet der Inhibitor **74** um den Faktor 10000 schwächer als die Referenzverbindung **4** an Furin. Offenbar spielt nicht die passende Größe, sondern viel mehr die ausgeprägte Basizität des 4-Amba-Restes die entscheidende Rolle zur Furinhemmung. Der *tight-binding*-Inhibitor **76** mit einem Fluor-substituierten Benzamidin als P1-Rest bindet auch sehr affin an Furin. Im Vergleich zum unsubstituierten Benzamidin ($pK_a = 11.48$) ist die Basizität durch das stark elektronegative Fluoratom deutlich verringert, jedoch nicht gänzlich aufgehoben ($pK_a = 9.46$). Der zusätzliche Substituent in *m*-Position führt offenbar zu keinem signifikanten sterischen Konflikt. Der Fluor-substituierte 4-Amba-Baustein wurde in einem Patent für Furininhibitoren bereits beschrieben (Strongin et al., 2013).

Tabelle 12: Furininhibitoren mit modifiziertem P1- und basischem P5-Rest und Tle in Position P3.



Nr.	P1	pK_a^1	K_i (nM)	IC_{50} (nM)
70		-	n.b.	580±20
71		9.28	2.52±0.32	9.53±0.65
72		6.50	0.80±0.10	2.98±0.14
73		5.01	n.b.	900±80
74		0.88	450±10	1800±230
75		-	n.b.	3970±380
76		9.46	0.0223±0.0057	0.56±0.02
77		-	1495±346	5475±870

¹Berechnet für die acetylierten P1-Reste mit dem ChemAxon's pK_a plugin (<https://chemicalize.com/welcome>)

Die Synthese und enzymkinetische Charakterisierung der Verbindung **73** mit einem aromatischen Hydroxyamidin in P1-Position bereiteten einige Probleme (**Kapitel 3.1.7**). Die erste Synthese lieferte den gewünschten Inhibitor in sehr geringer Ausbeute, sodass kein NMR-Spektrum aufgenommen werden konnte. Die enzymkinetische Messung wurde aufgrund der starken Hemmwirkung unter *tight-binding*-Bedingungen durchgeführt, lieferte jedoch Werte, die an die Morrison-Gleichung nicht angepasst werden konnten. Die zweite Charge des Inhibitors wies eine viel geringere Furinhemmung auf (IC_{50} etwa $0.9\ \mu\text{M}$), die Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung scheiterte auch. Eine dritte Charge mit ausreichender Ausbeute wurde wieder unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen, die beobachtete Furinhemmung war jedoch deutlich schwächer als im Falle der ersten Charge. Da sich die Retentionszeiten analoger Amidin- und Hydroxyamidin-Verbindungen im dem von uns genutzten Standard-HPLC-System nicht unterscheiden, konnte der Grund für diese starken Unterschiede in der Hemmwirkung der verschiedenen Chargen erst mittels Massenspektrometrie und NMR-Untersuchungen identifiziert werden. Während die zweite Charge des Hydroxyamidin-Inhibitors keine Nebenprodukte enthielt, waren die anderen Chargen mit unterschiedlichen Mengen des analogen und sehr wirksamen Amidins **4** verunreinigt. Nach präparativer HPLC unter modifizierten Bedingungen konnte der Inhibitor **73** in reiner Form erhalten werden. Der IC_{50} -Wert der gereinigten Verbindung stimmte mit dem Wert der zweiten Charge überein. Die mangelhafte Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung liegt also nicht an einer Verunreinigung – der Inhibitor **73** weist vermutlich ebenfalls einen abweichenden Hemmmechanismus auf.

Die Morrison-Gleichung dient der Berechnung der K_i -Werte von *tight-binding*-Inhibitoren. Sie kann aber auch zur Bestimmung der exakten Enzymkonzentration angewendet werden (Dang and Di Cera, 1994; Stone and Hofsteenge, 1986). Die Konzentration an aktivem Enzym in einer Probe wird üblicherweise mittels *active site*-Titration bestimmt (Bravo et al., 1994). Eine weniger aufwendige Alternative ist die Messung der Enzymaktivität in Gegenwart eines sehr wirksamen *tight-binding*-Inhibitors in genau bekannter Konzentration. Dazu wird die Enzymkonzentration in der Morrison-Gleichung um einen Faktor korrigiert und die Messwerte an die modifizierte Gleichung angepasst. Auf diese Weise wird der Korrekturfaktor errechnet. Nach Multiplikation der ursprünglich angenommenen Enzymkonzentration mit diesem Faktor erhält man die genaue Konzentration des aktiven Enzyms. Umgekehrt kann man bei genau bekannter Enzymkonzentration mithilfe der Morrison-Gleichung die Inhibitorkonzentration in einer Probe bestimmen, indem man die Inhibitorkonzentration statt der Enzymkonzentration mit einem Faktor α korrigiert (**Gleichung 1**).

Gleichung 1: Variante der Morrison-Gleichung mit zusätzlichem Korrekturfaktor (α) für die Inhibitorkonzentration (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; v_0 : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors bei der entsprechenden Substratkonzentration; K_i^{app} : scheinbare (apparente) Inhibitionskonstante; $[I]_t$: totale Inhibitorkonzentration; $[E]_t$: totale Enzymkonzentration).

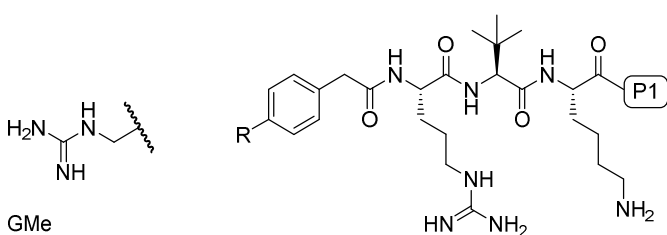
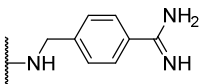
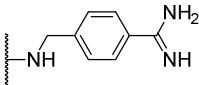
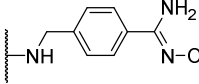
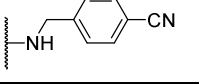
$$v = v_0 \times \frac{\left[(K_i^{app} + \alpha[I]_t - [E]_t)^2 + 4 K_i^{app} [E]_t \right]^{1/2} - (K_i^{app} + \alpha[I]_t - [E]_t)}{2 [E]_t}$$

Die Messwerte beider verunreinigter Chargen des Inhibitors **73**, die unter *tight-binding*-Bedingungen erhalten wurden, konnten problemlos an die modifizierte **Gleichung 1** angepasst werden. Die daraus berechneten K_i -Werte stimmten mit dem K_i -Wert des Inhibitors **4** überein. Die Korrekturfaktoren betrugen in den beiden Fällen 0.02 bzw. 0.38. Dies bedeutet, dass bei beiden Messungen praktisch die Hemmkonstante der Verunreinigung **4** bestimmt wurde und dass diese Verunreinigung in einer Konzentration von 2 bzw. 38 % in der vermessenen Probe vorlag. Die für dieses Analytikproblem angepassten HPLC-Messungen (Detektion bei 220 nm) ergaben eine 1- bzw. 60-prozentige Verunreinigung des Inhibitors **73** mit dem Benzamidin-Analogon **4** (**Abbildung 17**, S. 54). Die Verbindung **73** ist also an sich ein sehr schwacher Furininhibitor, könnte aber als *prodrug* des eigentlichen Inhibitors **4** fungieren – vorausgesetzt, dass das Amidoxim in dieser spezifischen Struktur durch entsprechende CYP-Enzyme als Substrat erkannt und zum Amidin umgesetzt wird, wie es beispielsweise für den Thrombininhibitor Ximelagatran beschrieben wurde (Clement, 2002). Ob dies der Fall ist, muss in weiteren Studien experimentell bestimmt werden.

3.2.2.7 Derivate mit Lys in P2-Position

Durch einige Modifizierungen des P1-Benzamidin-Restes wurde die allgemeine Basizität der Verbindung **4** reduziert, dabei wurde aber auch die Hemmwirkung meist drastisch beeinträchtigt. In der Struktur des Inhibitors **4** gibt es drei weitere stark basische Funktionalitäten. Der N-terminale 4-GMe-Phac-Rest und das P4-Arginin können nach bisherigem Kenntnisstand nicht ohne starke Affinitätsverluste ersetzt werden. Der Einbau eines P2-Lys wird dagegen toleriert (Becker et al., 2011), deswegen wurde das P2-Arg im Inhibitor **4** durch Lys ausgetauscht. Da aliphatische Amine einen deutlich niedrigeren pK_a -Wert (etwa 10) im Vergleich zu den entsprechenden Guanidinen (etwa 13) besitzen, lässt sich die Basizität der Verbindung durch diese Modifikation etwas verringern. Der erste Inhibitor in der P2-Lys-Serie (**106**) wurde bereits zuvor von Dr. Kornelia Hardes hergestellt. Als Vergleichssubstanzen wurden der Inhibitor **107** mit neutralem P5-Rest sowie weitere P2-Derivate in Kombination mit P1-Modifikationen dargestellt (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Furininhibitoren mit Lys in Position P2.

				
Nr.	R	P1	K_i (nM)	IC_{50} (nM)
106	GMe		0.0088±0.0049 ¹	0.63±0.19
107	H		0.645±0.075	2.21±0.45
108	GMe		n.b.	695±42
109	GMe		3025±318	10580±1131

¹bestimmt unter klassischen Bedingungen mit dem Substrat **12** (Kapitel 3.2.2.8)

Der Inhibitor **107** hemmt Furin etwa viermal schwächer als die analoge P2-Arg-Verbindung **2** (Abbildung 10, S. 20). Die Hemmung des Inhibitors **109** unterscheidet sich von der des entsprechenden P2-Arg-Analogons **77** (Tabelle 12, S. 81) um den Faktor 2. Die Hydroxyamidin-Verbindung **108** wies die gleiche Problematik wie der Inhibitor **73** (Tabelle 12) auf: Als marginale Verunreinigung enthielt sie das Benzamidin-Analogon **106**. Nach präparativer HPLC-Reinigung bei pH 4 wurde für das Lys-Hydroxyamidin-Derivat ein IC_{50} -Wert von etwa 0.7 μ M bestimmt. Die minimal stärkere Hemmwirkung im Vergleich zum Arg-Hydroxyamidin-Inhibitor könnte möglicherweise durch kleinste Spuren an Benzamidin erklärt werden, die durch die präparative HPLC nicht abgetrennt werden konnten, obwohl in den anschließenden analytischen HPLC-Trennungen kein Amidin detektierbar war. Die genaue Ursache ist demzufolge unklar.

Ein weiteres Problem wurde bei der kinetischen Analyse der Verbindung **106** festgestellt. Unter klassischen Messbedingungen hemmt sie Furin zu stark, sodass sie unter *tight-binding*-Bedingungen charakterisiert werden muss. Die Werte lassen sich jedoch nicht perfekt an die Morrison-Gleichung anpassen (Abbildung 23). Das ist ein Indiz dafür, dass die Verbindung **106** auch einen abweichenden Hemmmechanismus aufweisen könnte. In solchen Fällen wird ein IC_{50} -Wert bestimmt. Dieser Parameter ist jedoch zur Charakterisierung von *tight-binding*-Inhibitoren ungeeignet (Copeland, 2005). Das ist auch anhand einer praktisch durchgeführten IC_{50} -Bestimmung für die *tight-binding*-Inhibitoren **4**, **76** und **106** ersichtlich (Abbildung 24).

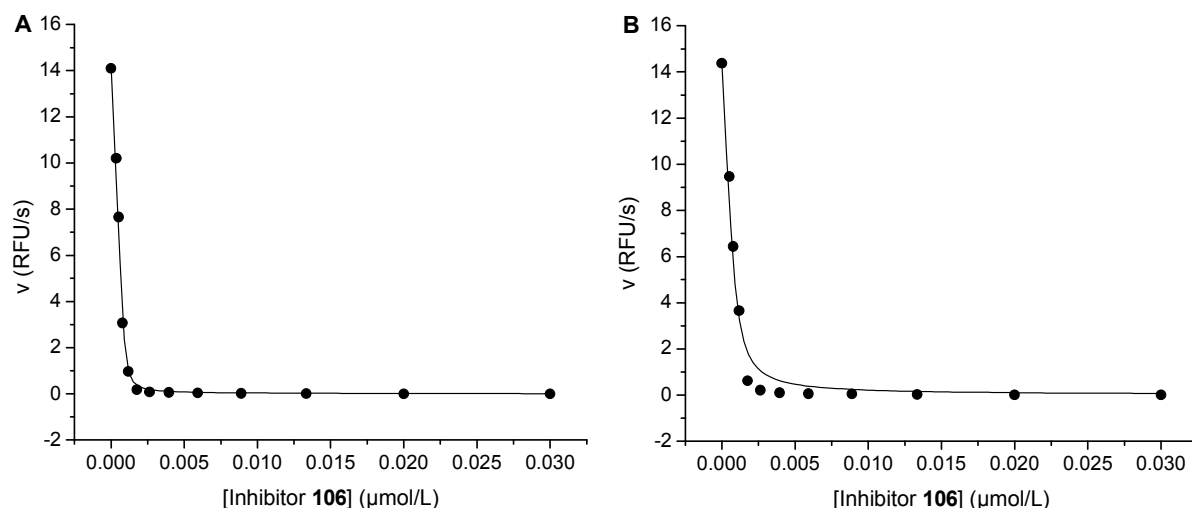


Abbildung 23: Messungen unter *tight-binding*-Bedingungen und Anpassung der Werte an die Morrison-Gleichung (Copeland, 2005; Williams and Morrison, 1979) (**Gleichung 13**, S. 195) für den Inhibitor **106** (Substrat: Verbindung **7**, $12.5 \mu\text{mol/L}$; Furinkonzentration: 0.95 nmol/L). **A:** Die berechnete Kurve passt relativ gut zu den experimentellen Messdaten; **B:** Die Kurve weicht im Bereich der sogenannten „*elbow region*“ deutlich ab. Zur Bestätigung der Diskrepanz wurden die Messungen mit dem Inhibitor **106** mehrfach wiederholt. In allen Fällen wurde eine Abweichung beobachtet, obwohl sie bei manchen Messungen etwas weniger stark ausgeprägt war.

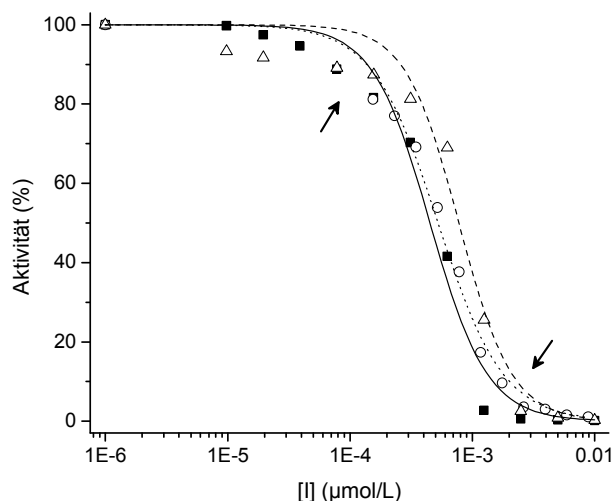


Abbildung 24: Bestimmung der IC_{50} -Werte für die *tight-binding*-Inhibitoren **4** (■), **76** (○) und **106** (△) (Substrat: Verbindung **7**, $12.5 \mu\text{mol/L}$; Furinkonzentration: 0.95 nmol/L). Die Pfeile kennzeichnen die Bereiche, in denen sich die Daten an die **Gleichung 11** (S. 194) nicht anpassen lassen.

Einerseits lassen sich die Werte nicht an die **Gleichung 11** (S. 194) zur Berechnung des IC_{50} -Wertes anpassen. Im Bereich der oberen und unteren Krümmung der sigmoidalen IC_{50} -Kurve sind die Abweichungen am stärksten ausgeprägt. Andererseits liegen die IC_{50} -Werte selbst bei

starken Unterschieden in der Bindungsaffinität (K_i -Werte) in einem sehr ähnlichen Bereich. Der K_i -Wert des Inhibitors **76** mit dem Fluor-substituierten Amba-Rest ist zum Beispiel um den Faktor 4 schwächer als der für die analoge Amba-Verbindung **4**, die experimentell bestimmten IC_{50} -Werte sind jedoch praktisch fast identisch (**Abbildung 24**). Der IC_{50} -Wert des 4-Amba-Inhibitors **106** mit Lys in P2-Position ist nur minimal höher. Bei sehr wirksamen Inhibitoren, bei denen das Verhältnis $K_i^{app}/[E]_t < 0.01$ ist, besteht keine Abhängigkeit zwischen dem IC_{50} - und dem K_i^{app} -Wert (Copeland, 2005). Der IC_{50} -Wert entspricht in solchen Situationen der Hälfte der Enzymkonzentration, in diesem Fall also ca. 0.5 nmol/L.

3.2.2.8 Charakterisierung hochwirksamer Furininhibitoren mit dem effizienteren Substrat **12** unter klassischen Bedingungen

Messungen unter klassischen Bedingungen sind generell weniger störanfällig. Minimale Schwankungen in der Enzymkonzentration können z.B. einen gravierenden Effekt auf die Messergebnisse unter *tight-binding*-Bedingungen haben, während die klassischen Messungen dadurch kaum beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden die standardmäßig angewendeten Messbedingungen und Konzentrationen so modifiziert, dass der Inhibitor **106** unter klassischen Bedingungen vermessen werden konnte. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die mangelhafte Anpassung an die Morrison-Gleichung durch eine ungenaue Enzymkonzentration oder sonstige Messfehler zustande kommt.

Die Vermessung sehr wirksamer Inhibitoren unter klassischen Bedingungen wurde mittels des neuen, sensitiveren Substrates **12** ermöglicht. Zu Beginn wurden unterschiedliche Enzym- und Substratkonzentrationen sowie Einstellungen des Fluoreszenz-Messgeräts ausprobiert, um optimale Messbedingungen zu finden. Die Enzymkonzentration konnte im Messansatz auf ein Zehntel reduziert werden (von 0.95 nmol/L auf 0.095 nmol/L). Die Messungen erfolgten bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen: 10, 5 und 2.5 μ mol/L im Messansatz. Dank des sensitiveren Substrates konnten dann selbst bei einer 100-mal höheren Inhibitorkonzentration im Vergleich zur Enzymkonzentration ausreichende Fluoreszenzänderungen detektiert werden. Durch die neu etablierte Messmethode kann neben der Vermeidung der *tight-binding*-Bedingungen auch der Verbrauch an Enzym und Substrat reduziert werden. Mehrere *tight-binding*-Inhibitoren wurden unter den modifizierten Bedingungen vermessen (**Tabelle 14**). Die Auswertung erfolgte durch Anpassung der Werte an die Gleichung für kompetitive Hemmung (z.B. für den Inhibitor **76** in **Abbildung 25A**). Die erhaltenen K_i -Werte für die Inhibitoren **15**, **16** (**Tabelle 4**, S. 66) und **76** (**Tabelle 12**, S. 81) sind praktisch identisch mit den unter *tight-binding*-Bedingungen bestimmten K_i -Werten. Somit wurde die Zuverlässigkeit der neuen Methode bewiesen. Lediglich für den

wirksamsten Inhibitor **4** wurde ein niedrigerer K_i -Wert bestimmt (2.5 pM anstatt 5.5 pM). Diese Verbindung zeichnet sich durch eine extrem hohe Bindungsaffinität aus, sodass bei deren Messung selbst unter Anwendung des sensitiveren Substrates kein ausreichendes Fluoreszenzsignal detektierbar war. Die *tight-binding*-Bedingungen konnten für diese Verbindung nicht umgangen werden. Nichtsdestotrotz eignet sich die neue Methode zur Vermessung von Inhibitoren mit K_i -Werten > 5 -10 pM.

Tabelle 14: K_i -Werte einiger hochwirksamer Furininhibitoren, bestimmt unter *tight-binding*- (mit dem Substrat **7**, Furinkonzentration im Ansatz 0.95 nmol/L) oder klassischen (mit dem Substrat **12**, Furinkonzentration im Ansatz 0.095 nmol/L) Bedingungen.

Nr.	K_i (pM)	K_i (pM)
	unter <i>tight-binding</i> -Bedingungen	unter klassischen Bedingungen
4	5.5	2.5
15	53.8	70.9
16	146	144
76	22.3	30.4
106	≈ 9 mit starken Schwankungen im Bereich von 4 bis 20 pM	8.8

Auch unter den modifizierten Bedingungen liefert die Vermessung der Verbindung **106** parabolisch gekrümmte Kurven in der Dixon-Auftragung. Die mangelhafte Anpassung der Messwerte an die Gleichung für kompetitive Hemmung (**Abbildung 25B**) ergeben K_i -Werte zwischen etwa 4 und 15 pM bei den unterschiedlichen Substratkonzentrationen und verschiedenen Messungen. Der für diesen Inhibitor in **Tabelle 13** (S. 84) angegebene K_i -Wert (8.8 pM) wurde als Mittelwert aus diesen Messungen berechnet. Trotz dieser Probleme bei der Bestimmung des exakten K_i -Wertes kann man sagen, dass der Inhibitor **106** Furin etwas schwächer als das analoge P2-Arg-Derivat **4** hemmt, aber wirksamer als der Hemmstoff **76** mit dem Fluor-substituierten 4-Amba-Rest in P1-Position ist.

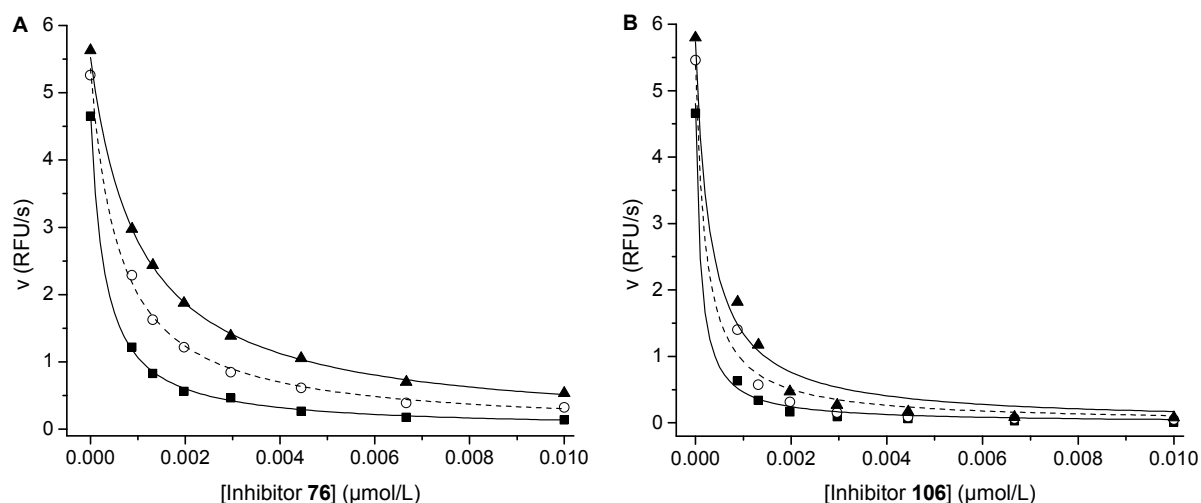


Abbildung 25: Hemmung der furinkatalysierten Spaltung des Substrates **12** (2.5 (■), 5 (○) und 10 (▲) $\mu\text{mol/L}$) durch die Inhibitoren **76** (A) und **106** (B) unter klassischen Bedingungen und Anpassung der Werte an die **Gleichung 10** (S. 193) für kompetitive Hemmung (Furin: 0.095 nmol/L im Messansatz).

3.2.2.9 Abweichender Hemmmechanismus

Das abweichende Verhalten im enzymkinetischen Test wurde bei vielen Inhibitoren unterschiedlicher Strukturtypen beobachtet. Im Folgenden wird versucht, die Gründe für dieses Verhalten aufzuklären.

Als Erstes wurde untersucht, ob die beobachteten Abweichungen durch eine nicht identifizierte Verunreinigung des jeweiligen Inhibitors verursacht werden können. Im folgenden Experiment wurde eine Stammlösung aus zwei klassischen kompetitiven Inhibitoren (**31**: 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn-Val-NH₂ und **67**: 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid) unterschiedlicher Bindungsaffinität im Konzentrationsverhältnis 1:1 hergestellt. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren hemmende Wirkung auf Furin unter klassischen Bedingungen untersucht wurde. Die *steady state*-Geschwindigkeiten v wurden anschließend als Funktion der Summe beider Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die Werte ließen sich ohne Probleme an die Gleichung für reversible kompetitive Hemmung anpassen. Der errechnete K_i -Wert (0.2 μM) lag zwischen den Hemmkonstanten beider Inhibitoren (K_i **31**: 0.8 μM , K_i **67**: 0.1 μM) und war praktisch doppelt so groß wie die Hemmkonstante des wirksameren Inhibitors. Wenn ein kompetitiver Inhibitor mit einem deutlich schwächeren kompetitiven Inhibitor verunreinigt ist, hat das keinen Effekt auf die Dixon-Auftragung oder die Qualität der Anpassung an die Gleichung.

Innerhalb der Gleichung für kompetitive Hemmung (**Gleichung 10**, S. 193) befinden sich die Komponenten $[I]$ und K_i in einem Term $[I]/K_i$, der im Rahmen der Messung eines konkreten Inhibitors bei einer definierten Inhibitorkonzentration konstant bleibt. Dies bedeutet, dass K_i

verkleinert wird, wenn für [I] ein niedrigerer Wert eingesetzt wird. Beide Komponenten werden dabei um den gleichen Faktor geändert. Wenn der Inhibitor also mit einer schwächer hemmenden oder nicht hemmenden Substanz zu x % verunreinigt ist, weicht der errechnete K_i -Wert um den Faktor $x/100$ vom wahren Wert ab, da die gedachte Inhibitorkonzentration sich um denselben Faktor von der tatsächlichen Inhibitorkonzentration unterscheidet. Eine ähnliche Situation liegt bei razemischen Mischungen (Guevara-Salazar et al., 2014) und auch im Falle des durchgeführten Experiments vor. Der Inhibitor mit der höheren Affinität bindet bevorzugt an das Enzym und verdrängt den schwächeren Hemmstoff. Der hemmende Effekt kommt also praktisch nur durch den Einfluss des stärkeren Inhibitors zustande. Der K_i -Wert der Inhibitormischung liegt genau um den Faktor 0.5 höher als die Hemmkonstante des Inhibitors **67**, da die tatsächliche Konzentration dieses Derivates 50 % der Gesamtkonzentration beträgt.

Wenn die *steady state*-Geschwindigkeiten v als Funktion der um den entsprechenden Faktor korrigierten Inhibitorkonzentration aufgetragen werden, stimmt auch der errechnete K_i -Wert mit der Hemmkonstante des stärkeren Inhibitors überein.

Anhand dieses Experiments konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Abweichungen bei der Auswertung bestimmter Inhibitoren nicht an Verunreinigungen liegen, sondern an den Inhibitoren an sich und konkreter an ihrem Bindungsmodus.

In Abwesenheit eines Liganden (Substrat oder Inhibitor) kann Furin auch in einer ligandenfreien, unproduktiven Konformation vorkommen, die nicht in der Lage ist, eine Substratumsetzung zu katalysieren (Dahms et al., 2016) (**Kapitel 1.3.4**). Es ist denkbar, dass der abweichende Bindungsmodus einiger Inhibitoren die produktive Konformation des Enzyms nicht erzeugen kann. Durch Zugabe eines zweiten, klassisch-kompetitiven Inhibitors zum Messansatz wurde versucht, die ligandengebundene Enzymkonformation zu induzieren und dadurch den Bindungsmodus des verkürzten Inhibitors **53** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-NH₂) zu beeinflussen. Hierbei wurde das viel schwächer, aber kompetitiv hemmende freie Benzamidin (K_i ca. 2 mM) in einer festen Konzentration von 2 mmol/L im Messansatz eingesetzt. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Qualität der Anpassung bzw. die Form der Dixon-Kurve. Außerdem interagiert auch das klassisch bindende Substrat mit dem Enzym und wird dadurch hydrolysiert, sodass eine aktive Konformation des Furin während der ganzen Messung gewährleistet sein sollte. Dieses Experiment verdeutlicht noch einmal, dass es sich bei der Verbindung **53** sowie bei den anderen oben erwähnten Derivaten um Inhibitoren mit einem alternativen Bindungsmodus handelt.

Da es sich bei allen Inhibitoren um substratähnliche Peptidderivate handelt, ist ein komplett anderer Bindungsmodus nur sehr schwer vorstellbar. Nichtsdestotrotz wurde z.B. ein inverser Bindungsmodus für ähnliche Derivate postuliert (López-Vallejo and Martínez-Mayorga, 2012).

Aus der Literatur sind verschiedene Hemmmechanismen bekannt. Eine mögliche Systematisierung der unterschiedlichen Inhibitor Klassen ist in **Abbildung 26** dargestellt (Leskovac, 2003b). Bei allen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Furininhibitoren handelt es sich um reversible Inhibitoren.

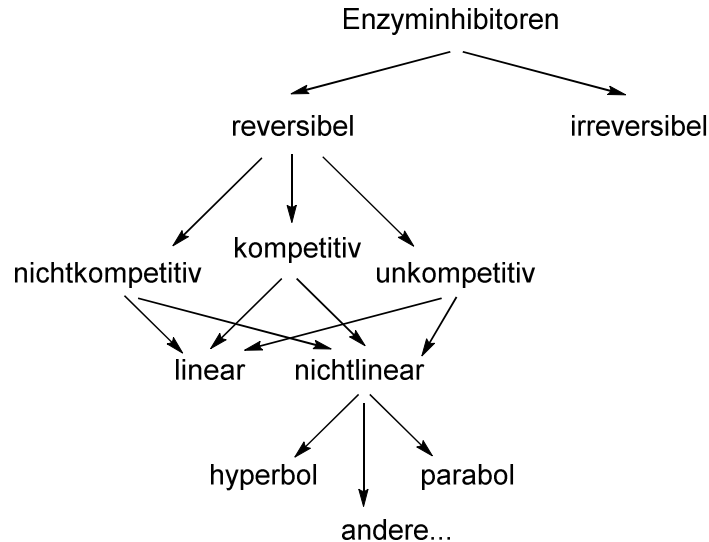


Abbildung 26: Klassifikation der Enzyminhibitortypen (Leskovac, 2003b).

Jeder Inhibitor Typ zeichnet sich durch ein unterschiedliches Verhalten in enzymkinetischen Messungen aus. Durch verschiedene graphische Darstellungen und Linearisierungsmethoden der Messwerte lässt sich dann oft der entsprechende Hemmmechanismus bestimmen oder zumindest ein unpassender Hemmmechanismus ausschließen. Anlehnend an die beschriebenen Auswertungsmethoden wurde nach einem Modell gesucht, das das Bindungsverhalten der Furininhibitoren am genauesten erklärt (**Abbildung 27**). Zu diesem Zweck wurde der Inhibitor **53** in 12 Konzentrationen bei jeweils vier verschiedenen Substratkonzentrationen vermessen.

Die Lineweaver-Burk-Auftragung der entsprechenden Messwerte liefert perfekte Geraden (**Abbildung 27A**) ohne einen gemeinsamen Schnittpunkt (**Abbildung 27B**, vergrößerte Darstellung des Schnittpunktbereichs aus der Lineweaver-Burk-Auftragung). Die Auftragung der Steigungen der Lineweaver-Burk-Geraden als Funktion der Inhibitor Konzentration liefert eine Parabel (**Abbildung 27C**). Daher handelt es sich bei der Verbindung **53** entsprechend der Einteilung von Leskovac in **Abbildung 26** um einen nichtlinearen und zwar parabol Furininhibitor (Leskovac, 2003a).

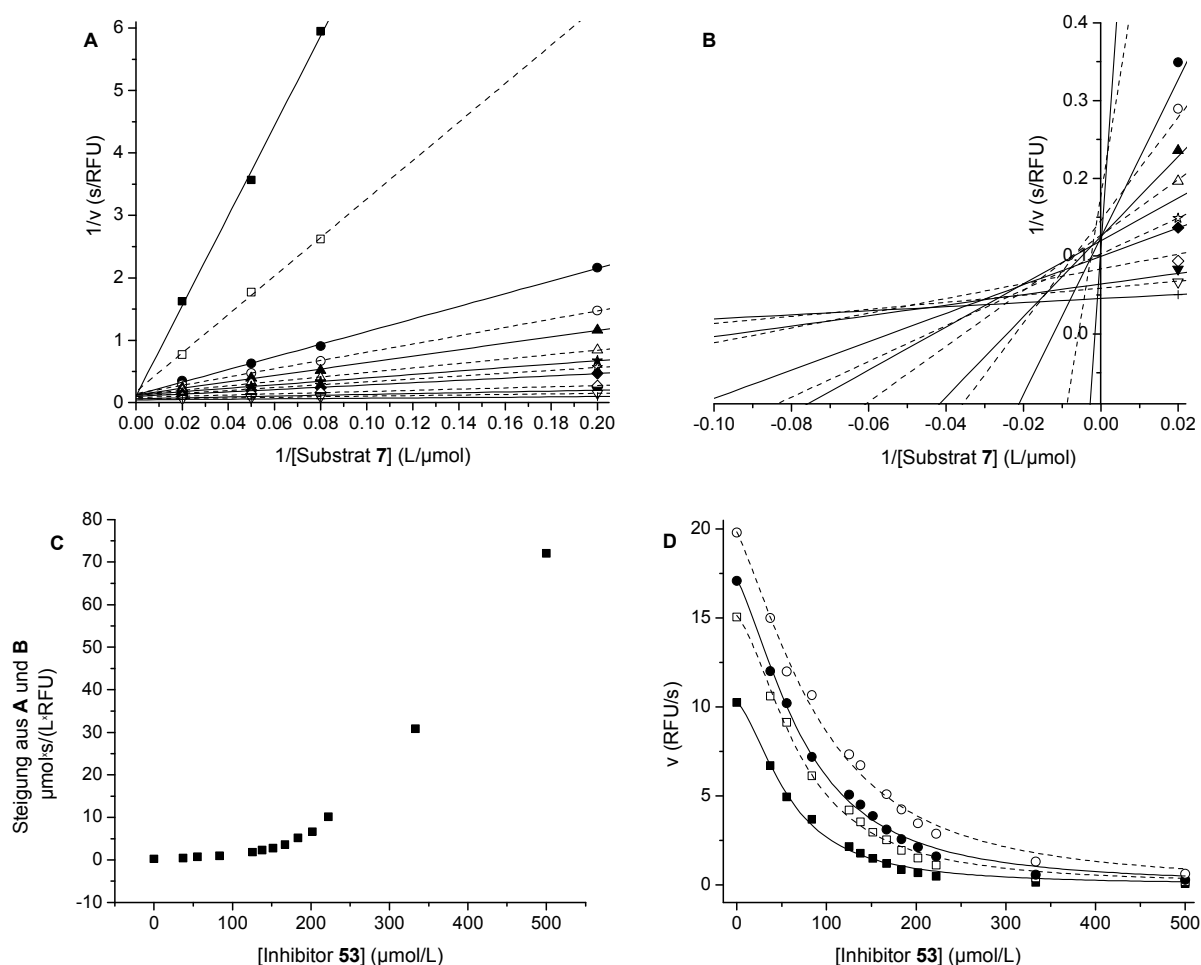
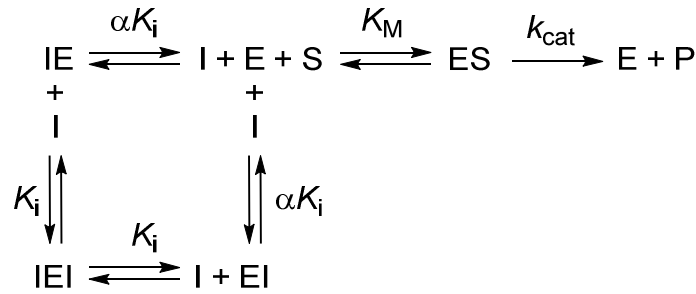


Abbildung 27: Erweiterte enzymkinetische Charakterisierung des Inhibitors **53** (Substrat: Verbindung **7**; Furinkonzentration bei allen Messungen: 0.95 nmol/L). **A:** Lineweaver-Burk-Auftragung; die Messungen erfolgten mit 12 verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen bei jeweils vier Substratkonzentrationen; **B:** Vergrößerte Darstellung der Lineweaver-Burk-Auftragung im Bereich der Schnittpunkte der Geraden; **C:** Auftragung der Steigungen in der Lineweaver-Burk-Auftragung gegen die entsprechende Inhibitor-Konzentration; **D:** Anpassung der Messwerte an die **Gleichung 2** für parabol kompetitive Hemmung; die Messungen erfolgten bei einer Substratkonzentration von jeweils 5 (■), 12.5 (□), 20 (●) und 50 (○) $\mu\text{mol/L}$.

Die Unterteilung zwischen linearen und nichtlinearen Inhibitoren basiert also auf der mathematischen Abhängigkeit der Steigungen aus den linearen Lineweaver-Burk-Auftragungen als Funktion der Inhibitor-Konzentration. Diese Abhängigkeit lässt sich bei linearen Inhibitoren durch eine lineare Funktion beschreiben, bei nichtlinearen Inhibitoren weicht die Kurve von der Linearität entsprechend ab. Auch jeder einzelne nichtlineare Inhibitortyp lässt sich in weitere Subtypen unterteilen (Leskovac, 2003a). Für den Inhibitor **53** passt das Modell der parabol kompetitiven Hemmung am ehesten (**Schema 13**).



Schema 13: Modell der parabolischen kompetitiven reversiblen Hemmung (E: Enzym; S: Substrat; P: Produkt; I: Inhibitor; ES: Enzym-Substrat-Komplex; EI bzw. IE: Enzym-Inhibitor-Komplex; IEI: Inhibitor-Enzym-Inhibitor-Komplex; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; k_{cat} : katalytische Konstante; K_i : Inhibitionskonstante; der Faktor α bezeichnet den Unterschied zwischen der Bindungsaffinität des Inhibitors zum vorgeformten EI- bzw. IE-Komplex und der Bindungsaffinität zum freien Enzym) (Leskovac, 2003a).

Dieses Modell setzt voraus, dass zwei Inhibitormoleküle gleichzeitig zwei verschiedene Bindestellen desselben Enzymmoleküls besetzen können. Die eine Stelle ist das aktive Zentrum. Die zweite, allosterische Bindestelle befindet sich woanders auf der Enzymoberfläche. Bei den möglichen Enzym-Inhibitor-Komplexen wird zwischen EI- (Bindung im aktiven Zentrum) und IE-Komplex (Bindung an der allosterischen Stelle) unterschieden. Ein ternärer IEI-Komplex ist auch möglich, ein Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex kann dagegen nicht gebildet werden. In **Schema 13** ist das einfachste, allgemeine Modell einer parabolischen kompetitiven Inhibition dargestellt, bei dem der Inhibitor mit derselben Affinität an beide Stellen des freien Enzyms (αK_i) oder des vorgeformten EI- bzw. IE-Komplexes (K_i) binden kann. Dieses Modell wird mathematisch durch **Gleichung 2** beschrieben. Die zweite Bindestelle am Enzym wird in der Formel durch die quadratische Abhängigkeit der *steady state*-Geschwindigkeit von der Inhibitorkonzentration wiedergegeben. Das heißt, der hemmende Effekt wächst überproportional mit steigender Inhibitorkonzentration.

Gleichung 2: Gleichung für die parabolische kompetitive reversible Enzymhemmung (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; $[I]$: Inhibitorkonzentration; K_i : Inhibitionskonstante; der Faktor α bezeichnet den Unterschied zwischen der Bindungsaffinität des Inhibitors zum vorgeformten EI- bzw. IE-Komplex und der Bindungsaffinität zum freien Enzym) (Leskovac, 2003a).

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times [S]}{K_M \times \left[1 + 2 \frac{I}{K_i} + \frac{1}{\alpha} \left(\frac{I}{K_i} \right)^2 \right] + [S]}$$

Die Messwerte der Verbindung **53** lassen sich an **Gleichung 2** zwar nicht perfekt, aber relativ gut anpassen (**Abbildung 27D**). Die errechneten α - und K_i -Werte sind jedoch stark abhängig von der Substratkonzentration sowie von den Startwerten, die vor der eigentlichen Anpassung manuell in das Programm eingegeben werden, sodass kein einheitlicher K_i -Wert bestimmt werden kann. Alle anderen Inhibitoren mit abweichendem Bindungsmodus verhalten sich genau so. Die Messwerte klassischer linearer kompetitiver Inhibitoren lassen sich jedoch an die Gleichung für parabol Hemmung nicht anpassen. Es kann also ausgeschlossen werden, dass ein zusätzlicher Faktor generell eine bessere Anpassung an eine beliebige Gleichung ermöglicht.

Es sind wenige Beispiele für parabol Inhibitoren bekannt. Innerhalb dieser Inhibitorklasse gibt es wiederum viele Subtypen, die zum Teil nur sehr spärlich in der Literatur beschrieben sind, sodass die genaue Zuordnung der neuen Furininhibitoren schwierig ist.

In der Literatur wurden zwei Bis-Benzamidin-Derivate beschrieben, die parabol kompetitive Trypsininhibitoren sind (Junqueira et al., 1992). Der parabol Effekt trat ab einer bestimmten Inhibitorkonzentration auf und wurde nur unter Anwendung eines bestimmten Substrates beobachtet. Mit einem anderen Substrat wurde für die gleichen Inhibitoren ein linearer kompetitiver Bindungsmodus bestimmt. Pentamidin, ein anderes Bis-Benzamidin-Derivat, zeigte dagegen eine lineare kompetitive Hemmung. Das Benzamidin ist also nicht die Funktionalität, die für die parabol Inhibition verantwortlich ist.

Von parabolen polypeptidischen Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) wurde auch berichtet (Lorey et al., 2003). Dieses Enzym besitzt bekanntermaßen neben dem aktiven Zentrum eine allosterische Bindetasche. Bei dem beschriebenen kinetischen Modell handelt es sich in diesem Falle um eine parabol gemischte Inhibition, die weitaus häufiger in der Natur vorkommt als die vereinfachte Variante in **Schema 13**. Bei dem parabolen gemischten Hemmmechanismus ist die Bildung des inaktiven ternären Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes auch möglich. Außerdem bindet der Inhibitor mit unterschiedlicher Affinität jeweils zum freien Enzym, zum EI-Komplex und zum ES-Komplex. Daraus resultieren in der dazugehörigen Formel (**Gleichung 3**) insgesamt drei zusätzliche Faktoren (α , γ und δ), die diese Unterschiede in den Bindungsaffinitäten widerspiegeln. Aufgrund der hohen Anzahl an Unbekannten in der Gleichung ist mit dem Programm ORIGIN 8.1 keine Anpassung der Messwerte des Inhibitors **53** gelungen. Alle graphischen Auswertungen, die für die DPP IV-Inhibitoren beschrieben wurden, stimmen jedoch mit dem Verhalten des Furininhibitors **53** komplett überein (**Abbildung 27A-C**).

Gleichung 3: Gleichung für die parabole gemischte reversible Enzymhemmung (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; $[I]$: Inhibitor-Konzentration; K_i : Inhibitionskonstante; die Faktoren α , γ und δ sind Ausdruck der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des Inhibitors zum ES-Komplex (α), zur allosterischen Bindetasche des freien Enzyms (γ) und zum vorgeformten EI-Komplex (δ) im Vergleich zur Bindungsaffinität zum aktiven Zentrum (K_i)) (Lorey et al., 2003).

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M \times \left[1 + \frac{I}{\left(\frac{\gamma}{1+\gamma} \right) K_i} + \frac{I^2}{\gamma \delta K_i^2} \right] + [S] \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right)}$$

Für einige der neu synthetisierten Furininhibitoren konnten bisher keine K_i -Werte berechnet werden. Beim kinetischen Modell kann aber trotzdem von einem parabolischen Mechanismus ausgegangen werden, bei dem zwei Inhibitormoleküle gleichzeitig an ein Enzymmolekül binden und somit den inhibitorischen Effekt überproportional verstärken. Somit kann erklärt werden, warum sich die Messwerte viel besser an eine quadratische Gleichung anpassen lassen und warum die Dixon-Auftragungen ebenfalls parabolische Kurven zeigen.

Ein weiterer analoger Beweis für die Existenz der allosterischen Furin-Bindetasche ist die halb-logarithmische Auftragung zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Furininhibitoren (**Abbildung 28**).

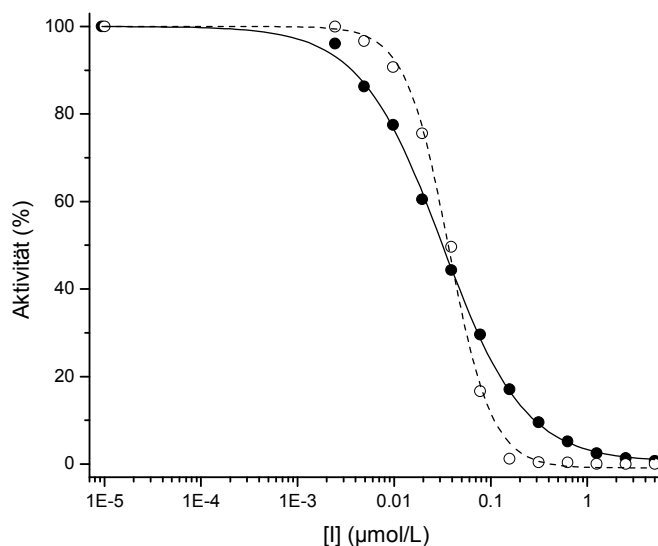


Abbildung 28: Bestimmung der IC_{50} -Werte für Inhibitoren **59** (○) und **66** (●) (Substrat: Verbindung **7**, 12,5 µmol/L; Furinkonzentration: 0,95 nmol/L). Die Messdaten wurden an **Gleichung 11** (S. 194) angepasst. Für beide Hemmstoffe wurde ein sehr ähnlicher IC_{50} -Wert bestimmt, sie unterscheiden sich jedoch im Exponenten p .

Die Kurve des linearen kompetitiven Inhibitors **66** (4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidomethyl-2-aminopyridin) hat im mittleren linearen Teil einen flacheren Anstieg als die Kurve des Inhibitors **59** (Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid) mit parabolem Hemmmechanismus. Die hemmende Wirkung auf Furin nimmt also mit steigender Konzentration des Inhibitors **59** stärker zu. Der Wert des Exponenten p aus **Gleichung 11** (S. 194) ist auch ein Indiz für eine zweite Bindestelle. Dieser Parameter ist ein Maß für die Steilheit des linearen Teils der IC_{50} -Auftragung und gibt Auskunft, analog zum Hill-Koeffizienten (Hill, 1913), über die Kooperativität der Inhibitorbindung. Die p -Werte der klassischen kompetitiven Inhibitoren liegen bei 1, die entsprechenden Werte der Inhibitoren mit parabolem Bindungsmodus etwa bei 2.

Vor Kurzem wurde eine Kristallstruktur des Furin im Komplex mit dem Inhibitor **5** veröffentlicht, in der jeweils ein Inhibitormolekül im aktiven Zentrum und in einer allosterischen Bindetasche oberhalb des aktiven Zentrums zu sehen ist (Dahms et al., 2017) (**Kapitel 1.3.4, Abbildung 15**). Diese Substanz wurde von Dr. Guan-Sheng Jiao zur kinetischen Testung bereitgestellt. Die Untersuchung der hemmenden Wirkung dieser Verbindung auf Furin zeigte überraschenderweise eine klassische lineare kompetitive Inhibition. Der aus dem K_i -Wert berechnete IC_{50} -Wert nach **Gleichung 12** (S. 194) stimmt mit dem experimentell bestimmten überein. Der p -Wert liegt bei 1. Die Bindung dieses Inhibitors an diese konkrete Stelle außerhalb des aktiven Zentrums ruft offenbar keine zusätzliche hemmende Wirkung hervor oder ist wahrscheinlich ein Artefakt, da während des *soaking* sehr hohe Inhibitorkonzentrationen (> 1 mmol/L) eingesetzt werden.

3.2.2.10 Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten

Zum Schluss soll noch einmal auf die vergleichsweise sehr starke Hemmwirkung des *m*-Anilin-Derivates **59** eingegangen werden. Dieser Inhibitor ist deutlich wirksamer als das entsprechende *p*-Anilin **57**, die Aminopyridine **61** und **62** und sogar das analoge Derivat **67** mit basischem 4-GMe-Phac-Rest in P5-Position. Die pH-Abhängigkeit der IC_{50} -Werte dieser fünf Derivate wurde im Rahmen eines kinetischen Experimentes untersucht (**Abbildung 29**). Die Messungen erfolgten bei einer einzigen Konzentration des Substrates **7** von 12.5 μ mol/L und bei jeweils drei verschiedenen pH-Werten (6, 7 und 8).

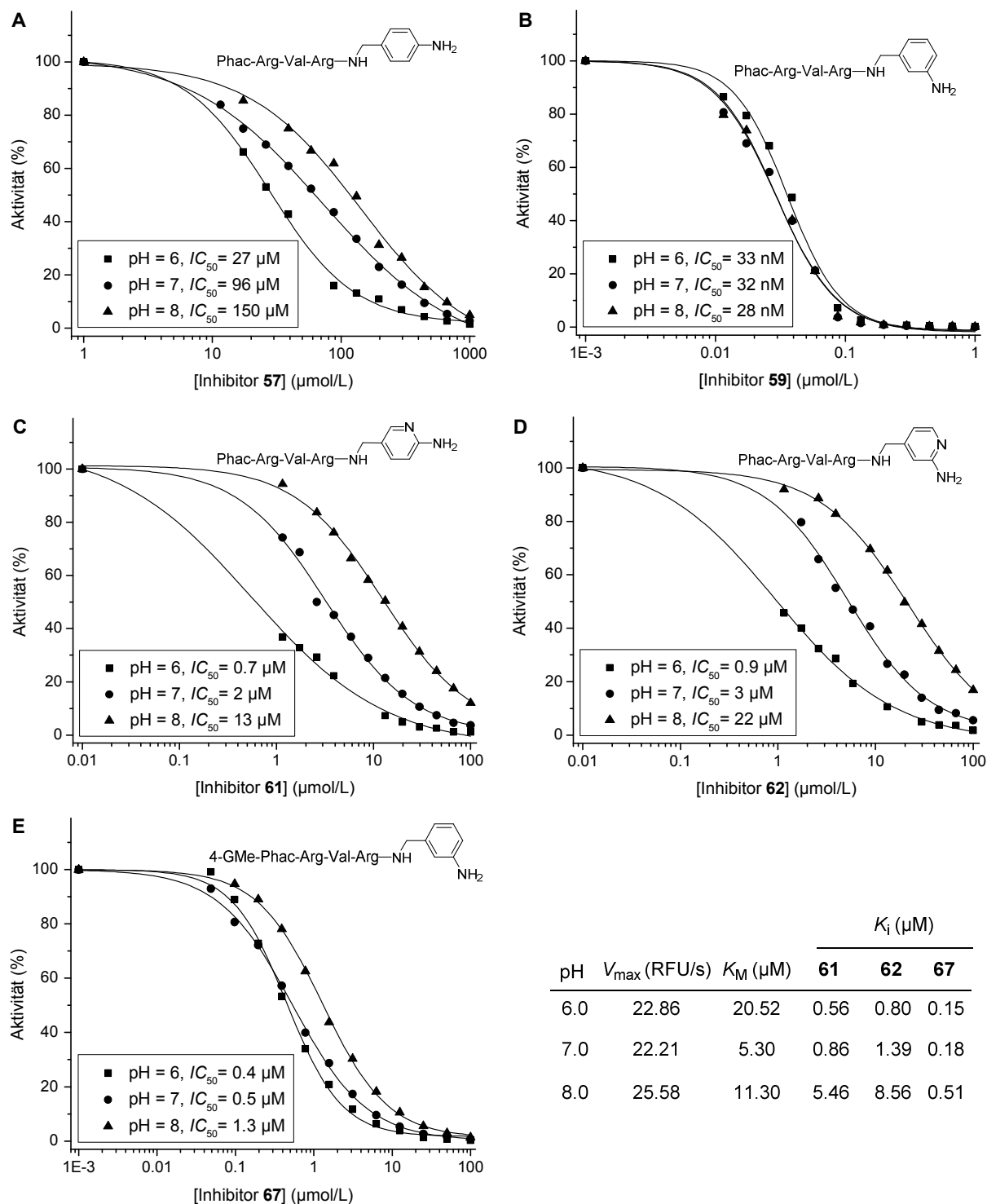


Abbildung 29: Bestimmung der IC_{50} -Werte der furinkatalysierten Spaltung des Substrates **7** ($12.5 \mu mol/L$) bei verschiedenen pH-Werten (Furinkonzentration im Messansatz: $0.95 nmol/L$). Zur besseren Darstellung, damit die Enzymaktivität in Abwesenheit eines Inhibitors in der logarithmischen Auftragung erscheint, wurde als Inhibitorkonzentration formal einfach ein sehr niedriger Wert statt Null angegeben und die Aktivität auf 100 % fixiert. Diese formale Manipulation hat keinerlei Einfluss auf die berechneten IC_{50} -Werte. Unten links sind die bei dem jeweiligen pH-Wert bestimmten V_{max} - und K_M -Werte des Substrates **7** sowie die K_i -Werte der klassischen kompetitiven Inhibitoren **61**, **62** und **67** angegeben. Für die Hemmstoffe **57** und **59** war keine Bestimmung ihrer K_i -Werte möglich.

Die Hemmwirkung der klassischen kompetitiven Inhibitoren mit Aminopyridin-Funktion in P1-Position (**61** und **62**) ist wie erwartet relativ stark pH-abhängig. Mit steigender Protonenkonzentration nehmen die entsprechenden IC_{50} -Werte merklich ab, bei pH 6 ist der IC_{50} -Wert ca. 20-fach niedriger als bei pH 8. Der Protonierungszustand dieser beiden Derivate beeinflusst die Furinhemmung. Bei einem niedrigeren pH-Wert liegt ein größerer Anteil des P1-Restes protoniert vor und kann daher wahrscheinlich günstigere Wechselwirkungen in der S1-Tasche des Furin ausbilden. Je höher der pH-Wert ist, desto schwächer wird die Bindung an das aktive Zentrum des Furin. Eine vergleichbare Tendenz liefert der klassische kompetitive Inhibitor **67** mit basischem P5-Rest. Die pH-Abhängigkeit seiner Hemmwirkung ist jedoch viel schwächer ausgeprägt: Bei pH 6 ist der IC_{50} -Wert nur ca. dreifach niedriger als bei pH 8. Vermutlich wird aufgrund des deutlich niedrigeren pK_a -Werts des *m*-Anilin-Restes in P1-Position ($pK_a = 4.27$) der Protonierungsgrad des P1-Restes bei diesen drei pH-Werten zwischen 6 und 8 nur wenig beeinflusst. Jedoch ist unbekannt, wie gut die berechneten pK_a -Werte der acetylierten P1-Reste mit den tatsächlichen pK_a -Werten der Inhibitoren nach Bindung dieser Reste in der S1-Tasche des Furin übereinstimmen.

Im Gegensatz dazu weist der analoge P1-*m*-Anilin-Inhibitor **59** mit neutralem P5-Rest, der Furin nicht nach einem klassischen kompetitiven Mechanismus hemmt, bei allen drei pH-Werten praktisch den gleichen IC_{50} -Wert um 30 nM auf. Vermutlich bindet dieser parabol Inhibitor an Furin auf eine Weise, bei der der Protonierungszustand des Anilins keine Rolle für die Affinität der Bindung spielt. Das könnte also bedeuten, dass bei der Bindung im aktiven Zentrum der P1-Rest nicht in die S1-Tasche hineinragt. Warum dagegen die hemmende Wirkung des analogen *p*-Anilin-Derivates **57** mit parabolem Hemmmechanismus wieder stark pH-abhängig ist, bleibt unklar. Möglicherweise bindet dieser Inhibitor, im Gegensatz zur Verbindung **59**, über den P1-Rest tatsächlich in der S1-Tasche, obwohl es schwer zu glauben ist, dass alleine die *p*- bzw. *m*-Position des Anilins für die Orientierung des Moleküls im aktiven Zentrum zuständig ist, zumal bei den analogen *p*- und *m*-Aminopyridinen kein solcher Effekt beobachtet wurde. Auch der *m*-Anilin-Rest des Inhibitors **67** mit basischem P5-Rest bindet offenbar normal in der S1-Tasche, demzufolge sollte das *m*-Anilin *per se* keine sterische Hinderung zur Bindung des Inhibitors in der S1-Tasche induzieren.

Prinzipiell ist auch denkbar, dass einer der Argininreste dieser Hemmstoffe mit ungewöhnlichem Bindungsmodus alternativ die S1-Tasche besetzt. Um eine mögliche Spaltung des Inhibitors **59** durch Furin auszuschließen, wurde auch die Stabilität dieses Hemmstoffs in Gegenwart des Enzyms mittels HPLC untersucht (**Kapitel 3.3**). Selbst nach einer Inkubation über 24 h wurde keine Bildung von Spaltprodukten festgestellt. Die ungewöhnlich starke Hemmung dieser Verbindung kann also nicht durch die Bindung des Arg-Restes in der S1-Tasche erklärt werden.

Keiner der neu synthetisierten Derivate mit modifizierten P1-Resten konnte die inhibitorische Aktivität der Referenzverbindung **4** übersteigen. Nichtsdestotrotz wurden einige Inhibitoren dargestellt, die Furin im niedrigen nanomolaren und sogar im zweistelligen pikomolaren Bereich hemmen. Ob die Modifizierungen zu einer Verringerung der Toxizität *in vivo* beitragen, muss in weiteren Studien untersucht werden. Für den Inhibitor **106**, das P2-Lys-Analogon der Leitstruktur **4** mit einer marginal schwächeren Hemmwirkung, wurde bereits eine bessere Verträglichkeit in Mäusen nachgewiesen (**Kapitel 3.5**).

3.2.3 Selektivitätsuntersuchungen mit PC1/3 und PC2

Die Selektivität ist generell ein wichtiges Kriterium bei jeder Wirkstoffentwicklung, da ein Einfluss auf sogenannte „*off-targets*“ zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Wie bereits in **Kapitel 1.2** erwähnt, besitzen die furinartigen PCs eine hohe Sequenzhomologie und ähnliche Substratspezifität. Besonders bei der Substratspaltung von Furin, PACE4, PC5/6 und zum Teil auch PC7 wurde in *in vitro*- und *ex vivo*-Untersuchungen eine Redundanz beobachtet (Seidah et al., 2008). Aber auch einige *in vivo*-Studien belegen eine teilweise Redundanz der Furinfunktionen mit der Aktivität verwandter PCs (Roebroek et al., 2004). Somit stellt die Entwicklung selektiver Furininhibitoren eine Herausforderung dar.

Die nah verwandten PCs weisen dennoch bestimmte Unterschiede auf. Die Substratspezifitäten dieser Enzyme sind zwar ähnlich, jedoch nicht identisch (Rockwell et al., 2002). Frühere Messungen substratanaloger Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest zeigten eine wirksame Hemmung der PCs Furin, PC1/3, PC4, PC5/6 und PACE4 mit vernachlässigbarer Selektivität, d.h., all diese PCs werden vergleichbar gehemmt. Dagegen ist die Inhibierung des PC2 und PC7 deutlich schwächer (Becker et al., 2012; Becker et al., 2010). Basierend auf der Kristallstruktur des Furin wurden Homologiemodelle der verwandten PCs erstellt und mögliche Unterschiede in den Enzymstrukturen beschrieben (Henrich et al., 2005). Unterschiede existieren vor allem in den Bereichen der PCs, die an der Bindung der Substratreste C-terminal der Spaltstelle beteiligt sind. Eine genaue Erklärung der Substrat- und Inhibitorspezifitäten ist jedoch ohne Kenntnis der Kristallstrukturen unmöglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Messungen mit den verwandten Proteasen PC1/3 und PC2 durchgeführt, da sie im Arbeitskreis vorhanden waren. Die katalytischen Domänen der PC1/3 und PC2 besitzen eine Sequenzhomologie von 61.4 % bzw. 55.5 % zur Proteasedomäne des Furin (Henrich et al., 2005). Diese zwei Proteasen sind vor allem in sauren sekretorischen Granula neuronaler und endokriner Zellen lokalisiert. PC1/3 ist in einem relativ breiten pH-Bereich

zwischen 5 und 7 wirksam und daher auch im TGN aktiv. PC2 besitzt dagegen ein engeres pH-Optimum im Bereich um pH 5.

PC1/3 und PC2 standen jedoch nur in begrenzten Mengen zur Verfügung, aus diesem Grund wurden nur einige ausgewählte Inhibitoren mit diesen Enzymen untersucht. Dabei wurden keine genauen Hemmkonstanten, sondern lediglich Restaktivitäten der beiden PCs in Gegenwart einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Inhibitors bestimmt (**Abbildung 30**). Die enzymatische Hydrolyse des AMC-Substrates **7** wurde in einem längeren Zeitintervall (etwa 1 h) verfolgt. Aus den Progresskurven wurden die entsprechenden *steady state*-Geschwindigkeiten berechnet. Die Aktivität ohne Inhibitor wurde als 100 % Restaktivität festgelegt.

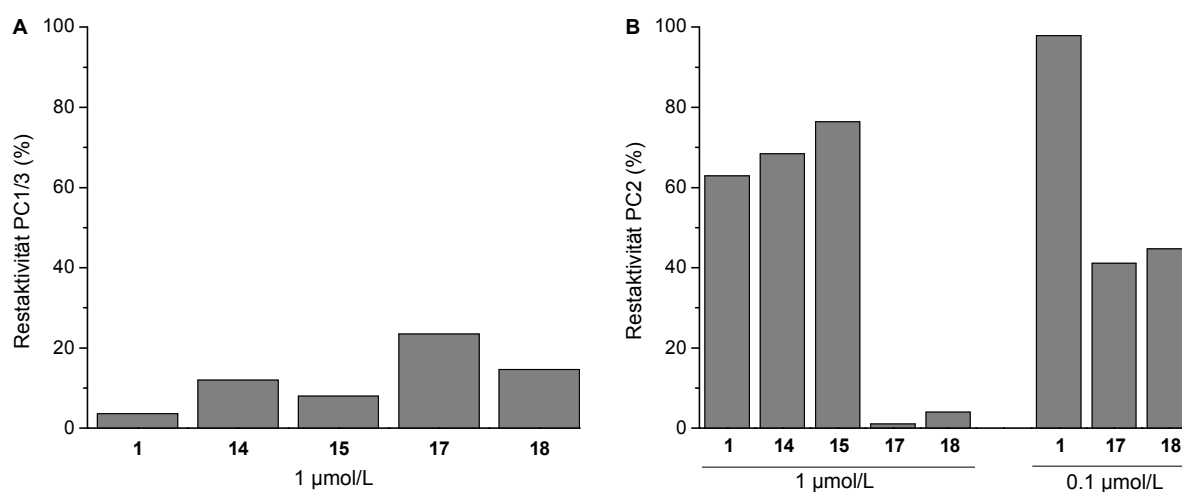


Abbildung 30: Bestimmung der Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf PC1/3 (**A**) und PC2 (**B**) (Substrat: Verbindung **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC), 200 µmol/L; die exakten Enzymkonzentrationen sind unbekannt, liegen jedoch im Bereich von ca. 0.005-0.02 g/L).

Als Referenzverbindung diente der bekannte lineare Inhibitor **1**. Alle Inhibitoren wurden zu Beginn bei einer Konzentration von 1 µmol/L vermessen. Die getesteten Derivate hemmen PC1/3 schwächer als die Referenzverbindung, obwohl das lineare 4-Amba-Derivat der schwächere Furinhemmstoff ist. Die etwas schlechteren zyklischen Furininhibitoren mit drei Arginin-Resten im Ring **14** und **17** zeigen auch einen geringeren inhibitorischen Effekt auf PC1/3 im Vergleich zu den Derivaten mit vier Argininen im Ring **15** und **18**. Die Furinhemmung durch die zyklischen Verbindungen korreliert mit der PC1/3-Hemmung auch in Bezug auf den P2-Rest. Die P2-Arg-Derivate **17** und **15** inhibieren PC1/3 (Restaktivität ca. 10 %) und Furin stärker als die Verbindungen **17** und **18** mit Lys (Restaktivität ca. 20 %).

Dagegen sind die P2-Lys-Derivate deutlich wirksamere PC2-Inhibitoren: Die Verbindungen **17** und **18** hemmen PC2 deutlich stärker als die Referenzverbindung **1**. Bei der ursprünglich benutzten

Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ zeigten diese Derivate sogar eine zu starke Hemmung (Restaktivität alle $< 5 \%$), sodass sie zur besseren Unterscheidung zusätzlich bei einer niedrigeren Konzentration vermessen wurden (**Abbildung 30B**). Bei der Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/L}$ zeigt die Referenzverbindung so gut wie keine Hemmung, wobei die P2-Lys-Derivate die Restaktivität der PC2 auf unter 50 % reduzieren. Anders als im Falle des Furin und der PC1/3 lässt sich die Aktivität der PC2 stärker durch die zyklischen Inhibitoren mit kleineren Ringen (**14** und **17**) reduzieren.

Eine Hemmung der PC1/3- und PC2-Aktivität könnte zu unerwünschten Effekten wie Wachstumsstörungen, Adipositas und Diabetes führen (Seidah and Prat, 2012). Jedoch basieren diese Erkenntnisse vor allem auf Studien mit *knockout*-Mäusen, und es ist unklar, welchen Einfluss eine Hemmung dieser PCs beim erwachsenen Menschen haben würde. Es ist auch kaum zu erwarten, dass die PCs *in vivo* zu 100 % inhibiert werden – es sollten immer gewisse Restaktivitäten vorhanden sein. Jedoch ist es bei der Wirkstoffentwicklung prinzipiell von Vorteil, selektive Inhibitoren zu entwickeln. Andererseits ist unklar, ob eine ausschließliche Furinhemmung, z.B. im Rahmen einer medikamentösen Behandlung, einen ausreichenden therapeutischen Effekt zeigen würde, da die Aktivität des Furin durch andere PCs kompensierbar sein könnte.

3.3 HPLC-Stabilitätsprüfungen

Für mehrere Furininhibitoren unterschiedlicher Typen wurden bei den enzymkinetischen Messungen Abweichungen von den üblichen Hemmmechanismen festgestellt (**Kapitel 3.2.2.9**). Wenn diese Inhibitoren auch als Substrate agieren, d.h., wenn sie durch Furin gespalten werden, kann man durch Analyse der entsprechenden Abspaltprodukte Rückschlüsse auf ihr Bindungsverhalten ziehen. Aus diesem Grund wurden einige Inhibitoren für unterschiedliche Zeitintervalle mit Furin inkubiert und anschließend mittels HPLC auf Abspaltprodukte untersucht.

Der Inkubationsansatz basiert auf dem enzymkinetischen Messansatz (**Tabelle 19**, S. 190). Zunächst wurden wässrige Stammlösungen der Inhibitoren mit einer Konzentration 5 mmol/L hergestellt, die anschließend auf 500 µmol/L verdünnt wurden. Daraus wurden für die Inkubationsversuche jeweils 20 µL entnommen und in einem Mikroreaktionsgefäß mit 160 µL Furin-Puffer und 20 µL einer Furin-Stammlösung (9.5 nmol/L) versetzt; die finale Konzentration der Inhibitoren im Ansatz betrug demzufolge immer 50 µmol/L, die des Furin 0.95 nmol/L. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Das Mikroreaktionsgefäß wurde gelegentlich vorsichtig geschwenkt. Durch Zugabe von 5 µL konz. TFA und anschließendes Vermischen mit dem Vortexmischer wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden 150 µL des Ansatzes in die analytische HPLC 2 (**Kapitel 5.1.2**) injiziert. Für die Negativkontrollen (Peptidderivat ohne Zugabe von Furin) sowie für die Chromatogramme mancher Referenzverbindungen wurden jeweils 20 µL der Peptidlösungen und 180 µL Puffer eingesetzt und vor der Injektion mit 5 µL konz. TFA angesäuert und durchmischt.

Als Erstes wurde die Methode mithilfe des Fluoreszenzsubstrates **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) etabliert. Zunächst musste die Dauer der Inkubation des AMC-Substrates mit Furin festgelegt werden. Die Progresskurve der enzymatischen Umsetzung eines Substrates hat eine charakteristische Verlaufsform (eine typische Progresskurve ist in **Abbildung 19**, S. 61, dargestellt). Solange das Substrat im vielfachen Überschuss zum Enzym vorliegt und folglich die *steady-state*-Bedingungen gewährleistet sind, wächst die Fluoreszenz linear mit der Zeit. Nachdem etwa 10 % des Substrates umgesetzt worden sind, kommt es zu einer hyperbolen Krümmung der Progresskurve, bevor die Plateau-Phase (kein weiterer Substratumsatz, dementsprechend auch kein weiterer Fluoreszenzanstieg) erreicht wird. Des Weiteren wurde die Zeit ausgerechnet, die für einen 10-prozentigen Substratumsatz (also für den Umsatz von ca. 5 µmol/L der Verbindung **7**) notwendig ist. Es wurde davon ausgegangen, dass die entsprechende Menge an Spaltprodukt bei einem 10-prozentigen Umsatz ausreichend für eine zuverlässige HPLC-Detektion ist.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der AMC-Konzentration am verwendeten Fluoreszenz-Messgerät mit identischen Geräteeinstellungen wurde bereits von Dr. Gero Becker untersucht (Becker, 2011). Die Fluoreszenz verschiedener AMC-Lösungen unterschiedlicher Konzentration wurde vermessen und daraus wurde eine Kalibriergerade erstellt. Diese besagt, dass eine AMC-Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ eine Fluoreszenz von etwa 45 000 RFU verursacht. Demzufolge würde der Umsatz von 5 $\mu\text{mol/L}$ des Substrates **7** (10 % der Gesamtkonzentration im Ansatz) den fünffachen Fluoreszenzwert, nämlich 225 000 RFU, ergeben. Der lineare Teil der Progresskurve der Spaltung des Substrates **7**, die bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ und unter den standardmäßig angewendeten Bedingungen erhalten wurde, hat eine Steigung von etwa 20 RFU/s. Daraus ergibt sich letztendlich für den 10-prozentigen Umsatz eine Reaktionszeit von gut 3 h.

Es war also nicht überraschend, dass nach jeweils 5, 10, 15 und 30 min Inkubation mit Furin keine Spaltprodukte anhand der HPLC detektierbar waren. Erst nach 45 min erschienen im Chromatogramm des Inkubationsansatzes mit der Verbindung **7** zwei marginal kleine zusätzliche Peaks (**Abbildung 31B**; **Abbildung 31A** stellt das Chromatogramm der Verbindung **7** ohne vorhergehende Inkubation mit Furin dar). Bei der Bestimmung des Reaktionsfortschritts durch Auswertung der Peakflächen (*area under the curve*) muss beachtet werden, dass die beiden Spaltprodukte (peptidischer Teil ohne AMC und freies AMC) und das intakte Substrat bei der Detektionswellenlänge von 220 nm unterschiedlich stark absorbieren. Grob kann davon ausgegangen werden, dass die Gesamtaborption beider Spaltprodukte der des intakten Substrats entspricht. Der prozentuale Anteil der zwei Abspaltprodukt-Peaks, bezogen auf die Gesamtpeakfläche, entspricht also näherungsweise dem prozentualen Substratumsatz. Darauf basierend lässt sich nach einer Inkubationszeit von 45 min ein 2-prozentiger Umsatz feststellen, nach einer Reaktionszeit von 3 h werden etwa 8 % des Substrates gespalten (**Abbildung 31C**). Dieser Wert stimmt auch ungefähr mit dem theoretisch ausgerechneten Wert überein. Nach einer Inkubation mit Furin für jeweils 6, 9 und 24 h kommt es zu einem entsprechenden Umsatz von 15, 22 und 53 %. Diese Werte deuten darauf hin, dass ab einem Umsatz von etwa 10 % keine lineare Zeitabhängigkeit der enzymatischen Reaktion mehr vorliegt.

Die Identität des Hydrolyseproduktes mit einer Retentionszeit von 9.8 min (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-OH) wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt. Der Peak bei 11.0 min wird durch das gebildete AMC verursacht – freies AMC weist die gleiche Retentionszeit auf (**Abbildung 31D**).

Anhand der Inkubationsversuche mit dem fluorogenen Substrat **7** wurden die geeigneten Bedingungen der HPLC-Methode zur Stabilitätsuntersuchung von Peptiden in Gegenwart von Furin etabliert.

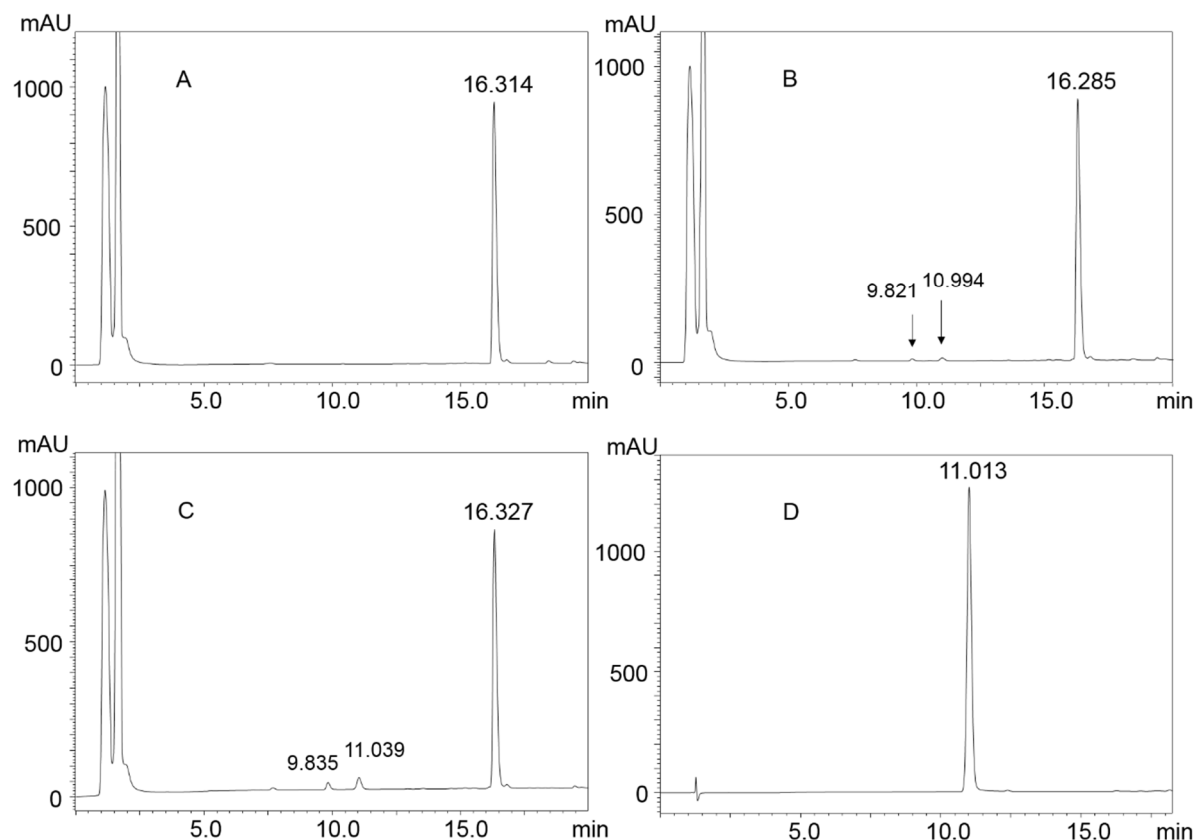


Abbildung 31: HPLC-Stabilitätsprüfungen der Verbindung **7**. **A:** Messung vor Zugabe von Furin; **B:** nach Inkubation mit Furin für 45 min; **C:** nach Inkubation mit Furin für 3 h; **D:** Chromatogramm des AMC. Die Inkubationsversuche erfolgten bei einer Konzentration der Verbindung **7** von 50 $\mu\text{mol/L}$ und ggf. einer Furinkonzentration von 0.95 nmol/L.

Das C-terminal verkürzte Derivat **54** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH₂) weist vermutlich einen anderen Bindungsmodus auf. Die Abweichungen bei der Auswertung nach der Methode für klassische kompetitive Inhibitoren sind zwar nicht so stark wie bei anderen Inhibitoren, aber trotzdem ausgeprägt. Eine denkbare Erklärung für dieses Verhalten lehnte sich an die Hypothese an, dass der basische P2-Arg-Rest die S1-Tasche adressiert und dementsprechend der P3-Tle-Rest in die S2-Tasche gerichtet ist. Diese Verschiebung des Bindungsmodus und die damit verbundenen sterischen Konflikte könnten zu den beobachteten Abweichungen führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Stabilität dieses Inhibitors durch Inkubation mit Furin geprüft. Wenn der basische P2-Rest tatsächlich in der S1-Tasche des Furin binden würde, könnte das C-terminale Argininamid als Substrat gespalten werden. Als Produkt würde die Verbindung **55** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-OH) entstehen.

Das Peptid **54** bleibt jedoch innerhalb der untersuchten 24 h Inkubationszeit in Gegenwart von Furin stabil. Die enzymkinetisch festgestellten Abweichungen vom normalen Bindungsmodus

können nicht durch eine teilweise Spaltung der Verbindung erklärt werden und müssen andere Ursachen haben.

Der Inhibitor **59** (Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid) mit einer sehr deutlichen Abweichung zum normalen kompetitiven Bindungsverhalten bleibt auch bei Inkubation mit Furin über 24 h absolut stabil.

Der klassische kompetitive Inhibitor **28** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH₂) mit einem unspaltbaren *linker* im P1-P1'-Bereich wird wie erwartet durch Furin auch nicht gespalten (untersuchte Reaktionszeit 3 h).

Der Inhibitor **38** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Gly-Val-NH₂) wird dagegen hinter dem P1-Arginin durch Furin hydrolysiert. Ein Chromatogramm dieses Derivates vor Inkubation mit Furin ist in **Abbildung 32A** dargestellt. Bereits nach 5 min kommt es zu einer Umsetzung von etwa 8 % (nicht gezeigt), nach 30 min sind es ca. 17 % (**Abbildung 32B**), nach 3 h über 90 % und nach 6 h ist das Peptid komplett gespalten. Als UV-aktives Abspaltprodukt entsteht die freie Carbonsäure **44** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-OH). Die Identität dieses Produktes wurde sowohl durch Massenspektrometrie des gesammelten HPLC-Peaks als auch durch Vergleich mit dem Chromatogramm der Referenzverbindung **44** bestätigt (**Abbildung 32F**). Nach einer Inkubation mit dem Enzym für 24 h entstehen keine weiteren Abspaltprodukte.

Diese Experimente lassen darauf schließen, dass das Peptid **38** deutlich effizienter als das Fluoreszenzsubstrat **7** umgesetzt wird. Wahrscheinlich verhindert der voluminöse AMC-Rest die optimale Bindung und/oder Umsetzung durch Furin. Die deutliche Instabilität des Peptids **38** wird im Rahmen der enzymkinetischen Untersuchung und anschließenden Auswertung nicht sichtbar: Die Progresskurven weisen keinerlei Krümmungen auf, und die Werte lassen sich anhand der Methode für klassische kompetitive Inhibitoren problemlos auswerten.

Die untersuchten Derivate mit abweichendem Bindungsmodus sowie einige der klassischen kompetitiven Inhibitoren bleiben in Gegenwart von Furin stabil. Andere kompetitive Inhibitoren werden dagegen durch das Enzym schon innerhalb des Messintervalls von ca. 25 min in signifikantem Maße hydrolysiert. Die Abweichungen im Hemmmechanismus stehen also in keinerlei Korrelation mit der Stabilität des jeweiligen Inhibitors.

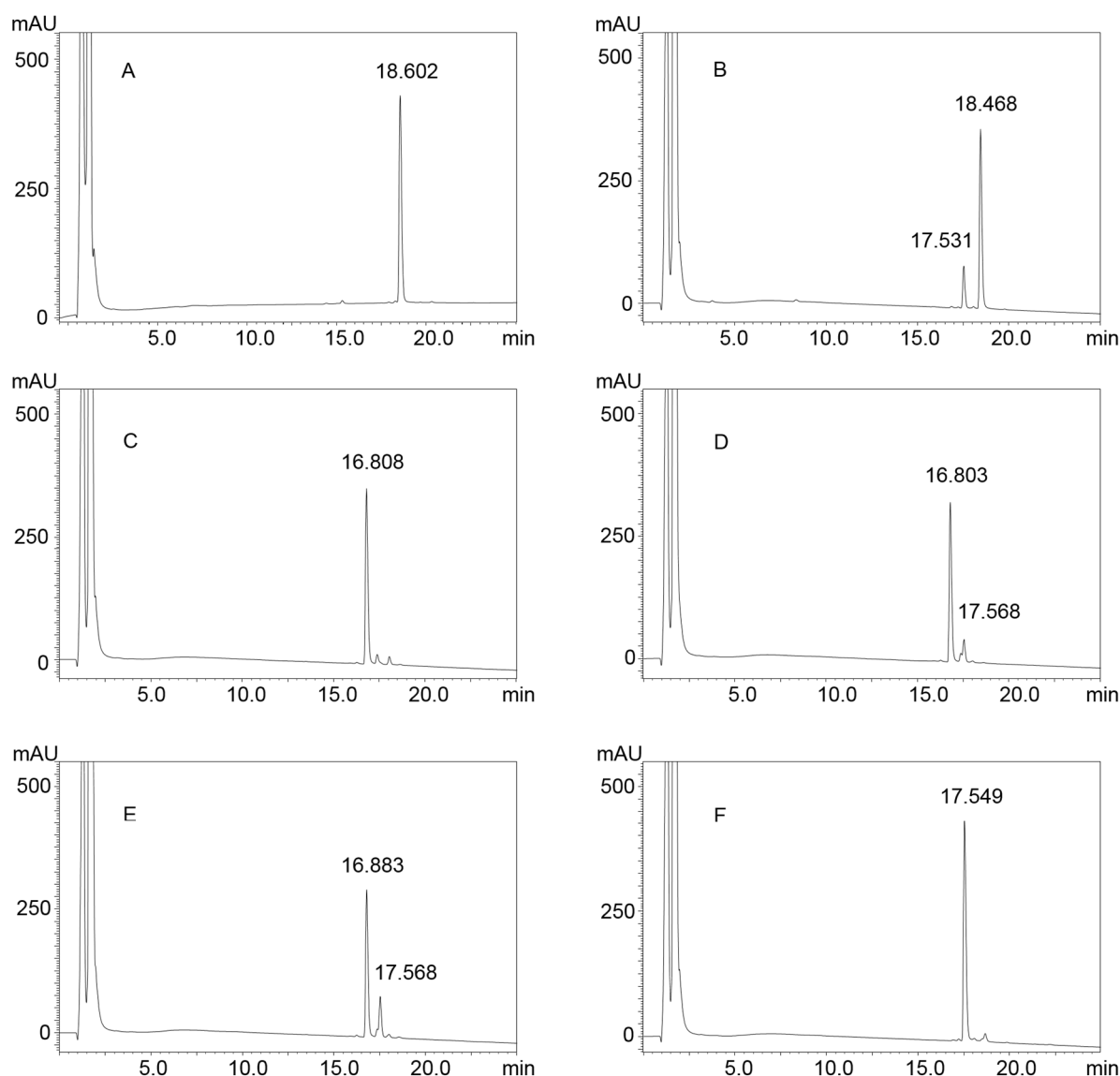


Abbildung 32: Weitere HPLC-Stabilitätsprüfungen. **A:** Chromatogramm des Inhibitors **38** vor Zugabe von Furin; **B:** Inhibitor **38** nach Inkubation mit Furin für 30 min; **C:** Chromatogramm des Inhibitors **43** vor Zugabe von Furin; **D:** Inhibitor **43** nach Inkubation mit Furin für 30 min; **E:** Inhibitor **43** nach Inkubation mit Furin für 70 min; **F:** Chromatogramm der Verbindung **44**. Die Inkubationsversuche erfolgten bei einer Konzentration des jeweiligen Inhibitors von 50 $\mu\text{mol/L}$ und ggf. einer Furinkonzentration von 0.95 nmol/L.

Bei den Stabilitätsuntersuchungen der Verbindungen **38**, **43** und **45** ließen sich andere interessante Effekte erkennen. Ein P1-C-terminales Amid sollte ein besserer Furininhibitor als die entsprechende Carbonsäure sein, da die Carboxylat-Struktur von der nukleophilen Seitenkette des Ser368 im aktiven Zentrum des Furin abgestoßen werden sollte. Diese Tendenz wurde tatsächlich im Falle der P1-Gly-Derivate **45** (Amid, 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-NH₂) und **46** (Carbonsäure, 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-OH) beobachtet, die sich deutlich in ihrer Hemmwirkung auf Furin unterscheiden. Jedoch haben die analogen P1-Arg-Derivate **43** (Amid)

und **44** (Carbonsäure) sowie **38** mit C-terminaler Verlängerung bis hin zum P2'-Rest nahezu den gleichen K_i -Wert.

Das C-terminale P1-Glycinamid **45** bleibt wie erwartet nach einer dreistündigen Inkubation mit Furin stabil. Das analoge P1-Argininamid **43** wird dagegen innerhalb von 30 min zu etwa 17 % gespalten (**Abbildung 32D**; **Abbildung 32C** stellt das Chromatogramm der Verbindung **43** ohne vorhergehende Inkubation mit Furin dar), nach 70 min liegt dieser Wert bei 26 % (**Abbildung 32E**, in diesem Chromatogramm lässt sich das neu gebildete Produkt besser von der kleinen Verunreinigung unterscheiden). Dabei entsteht als Produkt die entsprechende Carbonsäure **44** – das gleiche Abspaltprodukt, das auch bei der furinkatalysierten Hydrolyse des Inhibitors **38** entsteht (siehe oben).

Mittels der HPLC-Untersuchungen wurde letztendlich die Hypothese widerlegt, dass alleine die Instabilität eines Inhibitors in Gegenwart des Enzyms zu Abweichungen in der enzymkinetischen Auswertung führen kann. Es wurde auch gezeigt, dass sich die Bindungsweise eines Peptidinhibitors generell mithilfe der dargestellten Methode (d.h. durch Analyse der Abspaltprodukte) ermitteln lässt, solange das Peptid durch das jeweilige Enzym gespalten wird.

3.4 Zellkulturversuche

Die antivirale Aktivität ausgewählter Furininhibitoren wurde in unterschiedlichen Zellkulturtests untersucht. Bei den verwendeten Konzentrationen zeigten die Inhibitoren eine vernachlässigbare Zytotoxizität (Zellviabilität > 80 %).

3.4.1 Influenzaviren

Die Familie der *Orthomyxoviridae* enthält einzelsträngige RNA-Viren negativer Polarität ((-)ssRNA). Zu dieser Familie gehören u.a. die Gattungen Influenzavirus A, B und C (Hause et al., 2014; http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en, 2017). Influenzavirus A infiziert sowohl Menschen als auch einige Säugetiere und Vögel und verursacht weltweit epidemische und pandemische Ausbrüche. Influenzavirus B kommt fast ausschließlich in Menschen vor, jedoch seltener als Influenzavirus A, und ist auch für saisonale Epidemien zuständig. Influenzavirus C kann außer Menschen auch Schweine infizieren; die Infektionen verlaufen oft symptomlos oder führen zu leichten Erkrankungen der Atemwege, vor allem in Kleinkindern. Seit wenigen Jahren ist eine neue Gattung der *Orthomyxoviridae* bekannt – Influenzavirus D (Hause et al., 2014). Dieses mit Influenzavirus C stark verwandte Virus wurde bisher in Schweinen und Rindern gefunden.

Die Infektiosität der Influenzaviren hängt u.a. von zwei Pathogenitätsfaktoren ab – das Klasse I-Fusionsprotein Hämagglutinin (HA) und die Glykosidase Neuraminidase (NA), die beide in der Virushülle verankert sind. Die Klassifikation der unterschiedlichen Influenza-A-Virusstämme richtet sich nach den Subtypen dieser Membranproteine (H1 bis H18 und N1 bis N11) (<https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>, 2017).

Damit das Glykoprotein HA seine Funktion bei der Membranfusion erfüllen kann (siehe unten), muss es vorher durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Skehel and Wiley, 2000). Das HA wird in der infizierten Zelle als Vorläufer (HA0) synthetisiert. Das HA0 trimerisiert mithilfe von Chaperonen im ER und wird über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. In TGN-Kompartimenten findet die Spaltung des HA0 zu HA1 und HA2 statt. Diese Spaltung wird durch eine zelluläre Protease unternommen. Die HA0-Subtypen H1, H2 und H3, die die monobasische Spaltsequenz Q/E-X-R↓G-L-F besitzen, werden durch eine trypsinähnliche Serinprotease prozessiert. Das HA0 hochpathogener Vogelinfluenzaviren der Subtypen H5 und H7 besitzt dagegen polybasische Spaltsequenzen, die der Erkennungssequenz furinähnlicher PCs entsprechen (R-X-R/K-R) und folglich durch diese subtilisinähnlichen Proteasen gespalten werden.

Am Anfang einer Infektion bindet das Viruspartikel über das HA an Sialinsäure-haltige Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle und wird anschließend durch Endozytose in die

Wirtszelle aufgenommen (Skehel and Wiley, 2000). Die Sialinsäuren sind art- und zelltypspezifisch. Dies erklärt, warum einige Influenzaviren nur bestimmte Spezies oder Organe infizieren können. In manchen Fällen besitzt jedoch das HA einiger Influenzaviren Erkennungssequenzen für verschiedene Sialinsäuren oder die spezifischen Erkennungssequenzen sind sehr mutationsanfällig, sodass es auch zu zwischenartlichen Infektionsübertragungen kommen kann. Nach der Endozytose sorgen vakuoläre H⁺-ATPasen (V-ATPasen) auf der endosomalen Membran dafür, dass Protonen in das Endosom hineingepumpt werden, was letztendlich zur Senkung des pH-Wertes im Lumen führt (Watanabe et al., 2010). Die saure Umgebung (pH 5-6) löst einen irreversiblen Konformationswechsel im HA aus. Dieser Konformationswechsel wird durch die in einem vorangehenden Lebenszyklus stattgefundene Spaltung des Vorläufers HA0 in HA1 und HA2 ermöglicht. Infolgedessen wird das N-terminale Fusionspeptid in HA2 freigelegt, wobei die Struktur der HA1-Rezeptorbindungsdomäne erhalten bleibt. Die Interaktion des Fusionspeptids mit dem Endosom führt zur Fusion der viralen mit der endosomalen Membran und dadurch zur Freisetzung der viralen RNA in das Zellinnere.

Nach Translation und weiterer Reifung der viralen Proteine finden der Zusammenbau und die Ausknospung der neuen Virionen auf der Wirtszelloberfläche statt. Über das HA werden diese an Sialinsäure-haltigen Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche festgehalten. Die NA spaltet die Sialinsäuren von den Zellrezeptoren ab und setzt dadurch die reifen Viruspartikel endgültig frei (Watanabe et al., 2010).

Die HA-Subtypen, die eine monobasische Spaltsequenz besitzen, werden, wie bereits erwähnt, durch trypsinartige Serinproteasen aktiviert. Aufgrund der organspezifischen Expression dieser Enzyme kommt es meistens zu lokalen Infektionen, die bei Menschen auf den Respirationstrakt und bei Vögeln auf den Darm begrenzt sind (Skehel and Wiley, 2000). Dagegen werden HAs mit multibasischen Spaltsequenzen durch Furin oder furinähnliche Konvertasen prozessiert. Diese Enzyme kommen ubiquitär vor, was zumindest ein Aspekt ist, um die generalisierten Infektionen mit hoher Mortalitätsrate bei den hochpathogenen Vogelinfluenzaviren zu erklären (Garten et al., 1989). Furininhibitoren könnten demzufolge prinzipiell zur Therapie solcher Influenza-Infektionen eingesetzt werden, idealerweise in Kombination mit anderen antiviralen Wirkstoffen. Es wurde bereits gezeigt, dass Furininhibitoren die HA-Spaltung und auch die Virusvermehrung in Zellkulturen unterdrücken können (Becker et al., 2012; Becker et al., 2010; Garten et al., 1989; Harges et al., 2015; Lu et al., 2015).

Die zwei N-terminal verlängerten Peptidderivate **50** und **51** sowie einige der zyklischen Verbindungen wurden auf ihre protektive Wirkung gegen das hochpathogene Vogelinfluenzavirus A H7N1 (*fowl plague virus*, A/FPV/Rostock/1934) in MDCK II-Zellen untersucht (**Abbildung 33**).

Der Versuch wurde von Dr. Yinghui Lu in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2015; Lu et al., 2015). Die Referenzverbindung **4** zeigte schon bei einer Konzentration von 5 µmol/L eine deutlich ausgeprägte Schutzwirkung auf die infizierten Zellen. Einen ähnlichen, etwas schwächeren Effekt wurde bei der Verbindung **50** in einer Konzentration von 10 µmol/L beobachtet, beim Inhibitor **51** erst ab 50 µmol/L. Alle zyklischen Derivate bewirken erst in den höchsten eingesetzten Konzentrationen eine marginale Zellprotektion gegen das Influenzavirus. Für vergleichbare zyklische Strukturen mit der Sequenz c(Phe-2-Nal-(Arg)_{3/4/5}-Gln), die als Basis für die Synthese der Derivate **14-16** verwendet wurde, wurde zwar eine sehr gute Zellpenetration berichtet, nach Zellaufnahme sind die Verbindungen jedoch vor allem im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert (Qian et al., 2013; Qian et al., 2016). Die Ergebnisse dieser früheren Untersuchungen deuten darauf hin, dass die zyklischen Peptide vorwiegend durch Endozytose aufgenommen werden, danach aber weitgehend aus den Endosomen entkommen und letztendlich in das Zytoplasma freigesetzt werden. Um die Furinaktivität in Zellen beeinflussen zu können, muss der Inhibitor aber nicht das Zytoplasma, sondern die entsprechenden vesikulären Zellkompartimente (TGN, Endosomen, Lysosomen) erreichen. Wie aus diesem Experiment (**Abbildung 33**) ersichtlich wird, erreichen die spezifischen zyklischen Furininhibitoren die furinhaltigen Kompartimente in MDCK II-Zellen nicht besser als die unspezifischen zyklischen Oligoarginine oder die linearen Derivate.

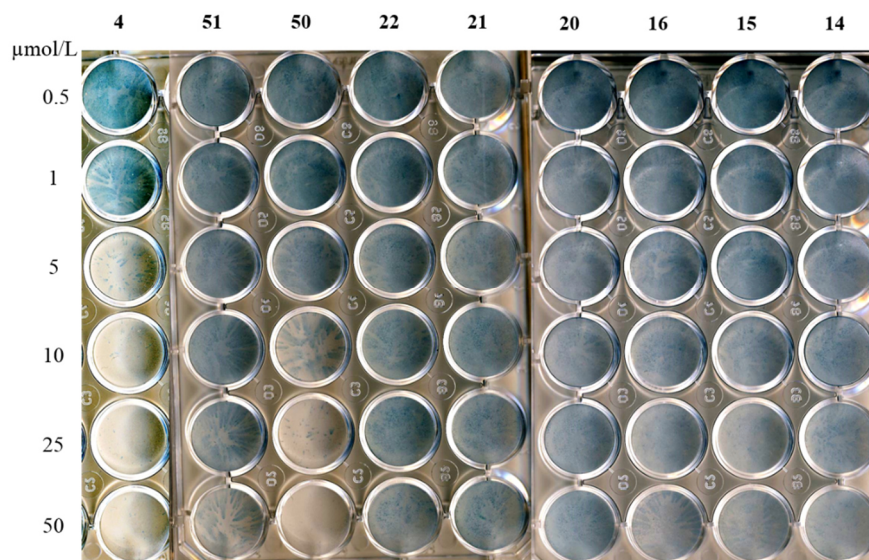


Abbildung 33: Protektive Wirkung ausgewählter Furininhibitoren auf MDCK II-Zellen, infiziert mit dem hochpathogenen Vogelinfluenzavirus A H7N1. Die Experimente wurden von Dr. Yinghui Lu in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2015; Lu et al., 2015). Zu Beginn wurden MDCK II-Zellen mit A H7N1 infiziert (MOI 0.001). Nach 1 h wurde ein neues Zellkulturmedium mit dem darin gelösten jeweiligen Inhibitor hinzugefügt. Nach einer anschließenden Inkubation für 24 h wurde die Virusvermehrung durch Immunfärbung mittels primärer Anti-FPV-Antikörper und sekundärer HRP-konjugierter Antikörper ausgewertet. Eine starke Virusvermehrung entspricht einer intensiveren Färbung.

Anhand eines anderen Experiments wurde direkt die Hemmung der proteolytischen Spaltung des H7-Vorläuferproteins HA0 in Gegenwart ausgewählter Furininhibitoren untersucht (**Abbildung 34**). Dieser Versuch wurde von Dr. Kornelia Hardes durchgeführt. Dafür wurden einige zur Verbindung **4** strukturanaloge Furininhibitoren mit Modifikationen in P1- oder P2-Position bereitgestellt.

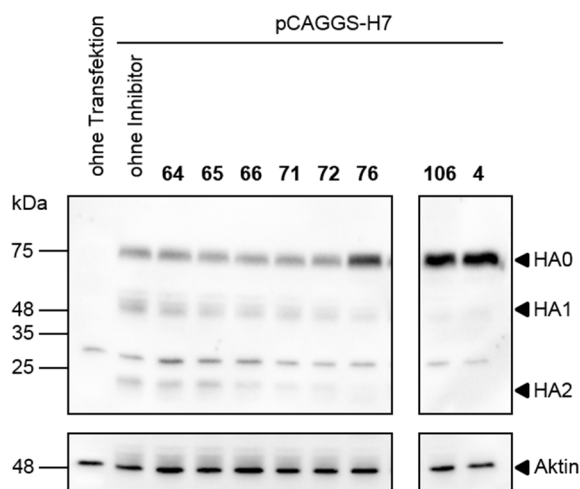


Abbildung 34: Hemmung der proteolytischen Spaltung des HA0-Subtyps H7 durch Furininhibitoren. HEK293-Zellen, die genügend endogenes Furin produzieren, wurden mit dem Plasmidvektor pCAGGS-H7 mittels *Lipofectamine* 3000 (Invitrogen) transfiziert. Das Plasmid exprimiert das Hämagglutinin H7 aus dem Stamm A H7N1 mit der durch Furin spaltbaren Sequenz PSKRRKKR↓GLFG. Nach 4 h wurden die Inhibitoren (25 $\mu\text{mol/L}$) zu den Zellen zugegeben. Insgesamt 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Lyse-Puffer (*CellLytic M*, Sigma Aldrich), der einen Proteaseinhibitor-Cocktail (100 \times , VWR) enthielt, versetzt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und die jeweiligen Überstände als Proben für SDS-PAGE vorbereitet (mit 6 \times SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt). Nach Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels der *Western blot*-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran (MerckMillipore, Porengröße 0.45 μm) überführt (Strom: 0.8 mA/cm 2 , 1 h) und abschließend durch Immunfärbung (primäre Anti-H7-Antikörper, sekundäre HRP-konjugierte Antikörper) sichtbar gemacht. Aktin wurde als Ladekontrolle vergewendet und mittels einer zusätzlichen Immunfärbung visualisiert. Die Molekülmassen der Markerproteine sind links in kDa dargestellt. Die Experimente wurden von Dr. Kornelia Hardes durchgeführt.

Sowohl für die P1-Benzylamine **64** und **71** als auch für die P1-Aminopyridine **65**, **66** und **72** wurde lediglich ein vernachlässigbarer Effekt beobachtet, der kaum von der Kontrolle ohne Inhibitor zu unterscheiden war. Das Fluor-substituierte Benzamidin **76** zeichnet sich dagegen durch eine signifikante Hemmung der HA0-Spaltung aus. Noch deutlicher ist die Aktivität des P2-Lys-Derivates **106**, das in diesem Experiment genauso wirksam wie die Referenzverbindung **4** ist. Unter diesen Bedingungen sind unter den getesteten Verbindungen nur die Furininhibitoren mit einer Hemmkonstante im pikomolaren Bereich in der Lage, eine sichtbare Hemmung der Hämagglutinin-Spaltung zu bewirken.

3.4.2 Alphaviren

Die Gattung *Alphavirus* der Familie *Togaviridae* enthält einzelsträngige RNA-Viren positiver Polarität ((+)ssRNA) (Strauss and Strauss, 1994). Zu dieser Gattung gehören u.a. Semliki-Forest-Virus (SFV) und Chikungunya-Virus (CHIKV), die durch Mücken übertragen werden. Die Infektiosität der Alphaviren hängt u.a. von zwei Hüllglykoproteinen ab – E1 und E2 (Rashad et al., 2014; Zhang et al., 2003). Das Fusionsprotein E1 ist in der Lage, durch ein hydrophobes Fusionspeptid mit der endosomalen Membran der Wirtszelle zu interagieren. Das sogenannte Begleitprotein E2 (*companion protein*) ist für die korrekte Faltung und Transport des E1 zuständig und bindet an den Rezeptor auf der Plasmamembran der Wirtszelle. Das E2 ist nicht direkt am Fusionsprozess beteiligt, ist aber für die Funktion des eigentlichen Klasse II-Fusionsglykoproteins E1 unerlässlich. Das Chaperon E2 wird als Vorläufer (p62) synthetisiert, der im ER mit E1 assoziiert (de Curtis and Simons, 1988; Rashad et al., 2014; Zhang et al., 2003). Das entstandene Heterodimer wird anschließend zur Zelloberfläche transportiert. Das Proprotein p62 wird dabei in einem post-TGN-Kompartiment mittels endoproteolytischer Spaltung durch eine furinähnliche Konvertase in E2 und E3 prozessiert. E1 bleibt mit E2 und E3 assoziiert, die proteolytische Reifung des p62 führt aber zur Destabilisierung des Komplexes. Der Zusammenbau (*assembly*) der Virionen fängt im Zytoplasma an. Anschließend findet die Ausknospung (*budding*) an der Zelloberfläche statt und die reifen Viruspartikel, verpackt in einer aus der Wirtszelle stammenden Lipidmembran, werden freigesetzt. Nach der nächsten Clathrin-vermittelten endozytotischen Aufnahme des viralen Partikels in die Wirtszelle und Transfer zum sauren Endosom dissoziiert der destabilisierte E1/E2-Komplex aufgrund des niedrigen pH-Wertes und ermöglicht die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran. Die Fusion und folglich die Infektiosität der Viren kann durch Mutationen in der p62-Spaltstelle und in Zellen mit geringer Furinproduktion beeinträchtigt werden (Rashad et al., 2014; Zhang et al., 2003). Die Furinaktivität, oder allgemein eine furinartige PC-Aktivität, spielt also eine entscheidende Rolle für die Virulenz der Alphaviren. Es wurde bereits berichtet, dass Furininhibitoren die Reifung des p62 beeinträchtigen und dadurch die Ausbreitung des SFV und CHIKV reduzieren (Harden et al., 2017; Ozden et al., 2008).

SFV-Infektionen können Erkrankungen in Menschen und Tieren verursachen (Atkins, 2013). Die Pathogenität und vor allem die Virulenz hängt jedoch sehr stark vom Stamm ab. Während für manche Stämme Infektionen mit schwerwiegenden Symptomen wie heftige, lang anhaltende Kopfschmerzen, hohes Fieber, Myalgie und Arthralgie beschrieben wurden, verursachen andere milde bis gar keine Beschwerden (Atkins, 2013; Strauss and Strauss, 1994). Die meisten Stämme, die für Laboruntersuchungen benutzt werden, sind von einem natürlich vorkommenden avirulenten Stamm abgeleitet und gelten als ungefährlich. Es wurde nur von einem einzelnen Todesfall nach

Infektion mit SFV unter Laborbedingungen berichtet. Als Todesursache wurde *post mortem* eine virale Meningoenzephalomyelitis bestätigt (Willems et al., 1979).

Obwohl SFV im Allgemeinen eine geringe Pathogenität in Menschen aufweist, ist es ein geeignetes Modell für Alphaviren, die zum Teil schwere Infektionen hervorrufen können (z.B. CHIKV). Aus diesem Grund werden SFV-Stämme bei mikrobiologischen Untersuchungen dieser Virusgattung häufig benutzt.

Einige Inhibitoren wurden auf ihre hemmende Wirkung gegen die SFV-Ausbreitung untersucht (**Abbildung 35A**). Die Experimente wurden von Dr. Bastian Thaa (Karolinska Institutet, Stockholm) nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2017).

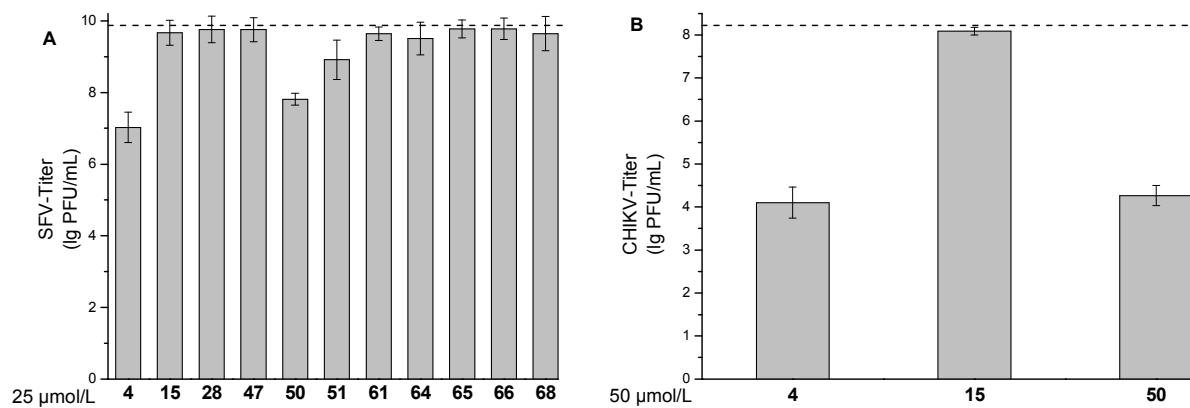


Abbildung 35: Auswirkung ausgewählter Furininhibitoren auf die Ausbreitung von SFV (A) und CHIKV (B) in BHK-21-Zellen. Die Experimente wurden von Dr. Bastian Thaa nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2017). BHK-21-Zellen wurden mit Furininhibitoren in einer Konzentration von 25 bzw. 50 µmol/L inkubiert und anschließend mit SFV (MOI 0.01) bzw. CHIKV (MOI 0.1) infiziert. Nach 24 h wurde der Überstand des Zellmediums gesammelt und der Virus-Titer in BHK-21-Zellen mittels eines *plaque assay* bestimmt. Die Werte wurden in PFU/mL angegeben. Daraus wurden die dekadischen Logarithmen ausgerechnet. Die gestrichelten Linien zeigen die jeweiligen Kontrollwerte an, die ohne Inhibitor erhalten wurden.

Als Referenzsubstanz diente der bekannte Inhibitor **4**. Dieser reduzierte den Virus-Titer um knapp drei Zehnerpotenzen im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Inhibitor **50** verursachte auch eine deutliche (etwa 100-fache) Reduktion des Titters. Die Verbindung **51** verringerte die Virusvermehrung lediglich um den Faktor 10. Alle anderen Derivate zeigten keinen Effekt trotz starker Unterschiede in den K_i -Werten. Ab einem K_i -Wert von ca. 30 pM (Inhibitor **47**) blieb die hemmende Auswirkung auf die Virusausbreitung praktisch komplett aus. Der zyklische Inhibitor **15** war trotz des pikomolaren K_i -Wertes auch unwirksam. Die zellpenetrierenden Eigenschaften dieses Derivats haben auch in diesem Experiment offenbar keinen Vorteil gegenüber den linearen Verbindungen.

Im Gegensatz zu SFV verursacht CHIKV, wie der Name dieses Virus zum Ausdruck bringt, Infektionen mit schwerwiegenden Symptomen (Atkins, 2013). In der ostafrikanischen Sprache Kimakonde bedeutet *chikungunya* „gekrümmt werdend“ und beschreibt die gebückte Haltung der unter der Infektion leidenden Patienten. Die Erkrankung geht mit plötzlich auftretendem hohem Fieber und lähmenden Gelenkschmerzen einher. Gelegentlich treten auch uncharakteristische Symptome wie Myalgie, Kopfschmerzen, Übelkeit und Hautausschlag auf. Die heftigen Gelenkschmerzen enden meistens innerhalb weniger Tage oder Wochen, in Einzelfällen kommt es aber nach überstandener Infektion zu wiederkehrenden Arthralgien.

Die Verbindung **50**, die nach dem Referenzinhibitor **4** die stärkste Reduktion der SFV-Titer verursachte, wurde auch auf ihre hemmende Wirkung gegen die CHIKV-Vermehrung getestet (**Abbildung 35B**). Auch das zyklische Derivat **15** wurde bei diesem Test verwendet. Der Inhibitor **4** reduzierte den Titer um vier Zehnerpotenzen. Als ungefähr genauso wirksam erwies sich der Inhibitor **50**. Der zyklische Inhibitor zeigte, wie im SFV-Test, praktisch keinen Effekt.

3.4.3 Flaviviren

Die Gattung *Flavivirus* der Familie *Flaviviridae* beinhaltet einzelsträngige RNA-Viren positiver Polarität ((+)ssRNA) (Mukhopadhyay et al., 2005). Genauso wie die Alphaviren verfügen die Flaviviren auch über ein Klasse II-Fusionsprotein (E) und ein Begleitprotein (prM). Letzteres wird durch Furin prozessiert. Das Protein E vermittelt sowohl die Bindung an die Membran der Wirtszelle als auch die Membranfusion (Lindenbach et al., 2007). Das Helferprotein prM bildet mit E ein Heterodimer im ER, wo auch der Zusammenbau (*assembly*) des viralen Partikels stattfindet, und überdeckt die Fusionsdomäne des E-Proteins. Im sauren Milieu des TGN wird anschließend das pr-Segment durch Furin abgespalten, das dabei entstandene M-Protein bleibt in der Membran verankert. Erst bei höherem pH-Wert außerhalb der Zelle wird das pr-Segment freigesetzt (Chambers et al., 1990). Nach Endozytose des reifen viralen Partikels wird die Membranfusion durch das Glykoprotein E eingeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass die prM-Spaltung und folglich auch die Membranfusion und die Infektiosität der Flaviviren durch Furininhibitoren und auch in Zellen mit fehlender Furin-Produktion verhindert werden (Kouretova et al., 2017; Stadler et al., 1997). Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass die Furin-Aktivität für die Virulenz der Flaviviren essenziell ist. Ein weiterer Faktor, der eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielt, ist die virale NS2B-NS3-Protease, die nach der Translation das virale Polyprotein im Zytoplasma prozessiert und somit essenziell für den Replikationszyklus der Flaviviren ist (Luo et al., 2015; Phoo et al., 2016). Zu dieser Gattung gehören u.a. die durch Mücken übertragbaren Dengue-Viren (DENV), West-Nil-Viren (WNV) und Zika-Viren (ZIKV).

DENV und WNV verursachen Infektionen mit milden bis schwerwiegenden Symptomen in Menschen weltweit (Mukhopadhyay et al., 2005), besonders in immuninkompetenten Personen. Unter allen Mitgliedern der Gattung der Flaviviren ist DENV mit der höchsten Pathogenität und Mortalität assoziiert. Wiederholte Infektionen mit unterschiedlichen DENV-Stämmen können zum typischen hämorrhagischen Denguefieber führen, das auch mild verlaufen, in einigen Fällen aber auch tödlich enden kann. Eine WNV-Infektion verläuft in den meisten Fällen symptomlos oder mit milden unspezifischen Beschwerden. Besonders gefährdet sich jedoch ältere Menschen oder Patienten mit einer ausgeprägten Immunschwäche, bei denen eine WNF-Infektion schwerwiegende neurologische Auswirkungen haben kann.

Die *N*-terminal verlängerten Derivate **50** und **51** sowie einige der zyklischen Verbindungen wurden in Huh7-Zellen auf Reduktion der DENV-2-Ausbreitung untersucht (**Abbildung 36**). Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Universität Heidelberg) nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kouretova et al., 2017). Als Referenzverbindungen dienten der Inhibitor **4** und das Virostatikum Ribavirin, ein Nukleosid-Analogon.

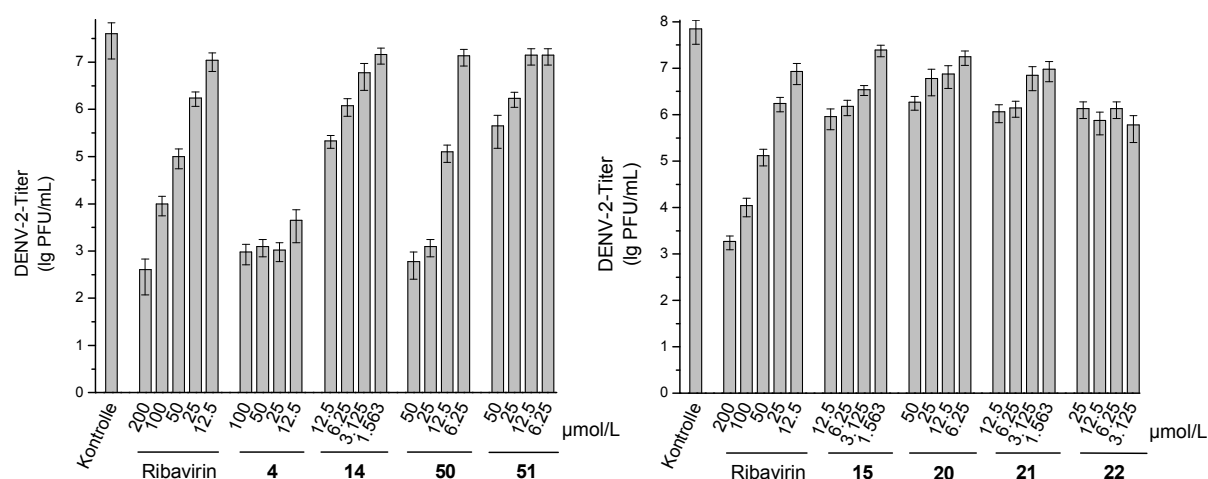


Abbildung 36: Auswirkung ausgewählter Furininhibitoren auf die Ausbreitung des DENV-2 in Huh7-Zellen. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kouretova et al., 2017). Huh7-Zellen wurden mit Inhibitoren variierender Konzentrationen inkubiert und mit DENV-2 infiziert (MOI 1). Nach 24 h wurde der jeweilige Überstand des Zellmediums gesammelt und der Virus-Titer in VeroE6-Zellen mittels eines *plaque assay* bestimmt.

Auch in diesem Experiment zeigte die Referenzverbindung **4** den stärksten inhibitorischen Effekt. Der Furininhibitor war sogar deutlich potenter als Ribavirin bei vergleichbaren Konzentrationen. Eine etwas geringere, aber immer noch bedeutsame Reduktion des Virus-Titers wurde für die Verbindung **50** beobachtet. Unter allen anderen Derivaten konnte kein signifikanter

Unterschied in der antiviralen Aktivität festgestellt werden. Die scheinbar relativ starke Wirksamkeit der Verbindung **22** bei niedrigen Konzentrationen liegt höchstwahrscheinlich an Messungenauigkeiten. Auch in diesem Test waren die zyklischen Inhibitoren mit den potenziell zellpenetrierenden Eigenschaften nicht wirksamer als die linearen Verbindungen.

In zwei weiteren analogen Experimenten wurden andere Verbindungen unterschiedlicher Inhibitorgruppen gegen DENV-2 (**Abbildung 37**) und WNV (**Abbildung 38**) getestet. Keins der untersuchten Derivate war wirksamer als die Referenzsubstanz Ribavirin. Die Verbindung **72**, die mit einer Hemmkonstante von 0.8 nM der stärkste Furininhibitor unter den getesteten Derivaten ist, zeigte auch die vergleichsweise stärkste antivirale Aktivität im DENV-2-Experiment (**Abbildung 37**). Alle anderen Furininhibitoren senkten nur marginal den Virus-Titer im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor. Interessanterweise waren die C-terminal verlängerten Derivate **37** und **38** mit K_i -Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich oder auch das Benzisoxazol-Derivat **74** mit einer moderaten Hemmkonstante von 0.4 μM vergleichbar aktiv wie deutlich wirksamere Inhibitoren (**51**, **47**) mit pikomolaren K_i -Werten. Die Polyleucine **48** und **49** zeigten auch einen ähnlichen, marginalen Effekt. Im Test gegen WNV (**Abbildung 38**) hatten alle Furininhibitoren lediglich eine vernachlässigbare Auswirkung auf die Virusvermehrung, wobei bei diesem Experiment das Virostatikum Ribavirin auch weniger wirksam als im DENV-2-Test in vergleichbaren Konzentrationen war.

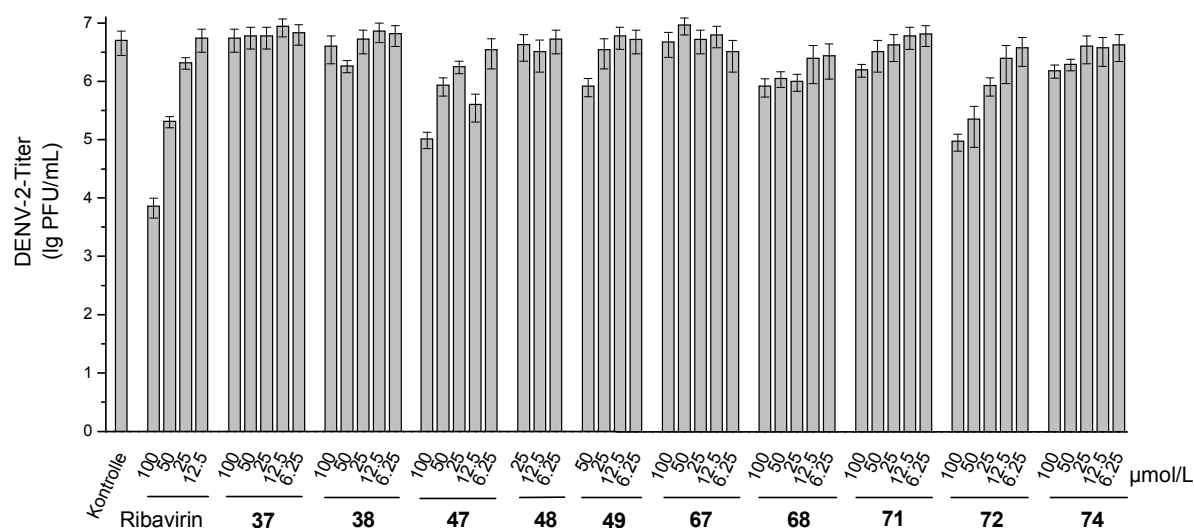


Abbildung 37: Auswirkung ausgewählter Furininhibitoren auf die Ausbreitung des DENV-2 in Huh7-Zellen. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kouretova et al., 2017). Huh7-Zellen wurden mit Inhibitoren variierender Konzentrationen inkubiert und mit DENV-2 infiziert (MOI 1). Nach 24 h wurde der jeweilige Überstand des Zellmediums gesammelt und der Virus-Titer in VeroE6-Zellen mittels eines *plaque assay* bestimmt.

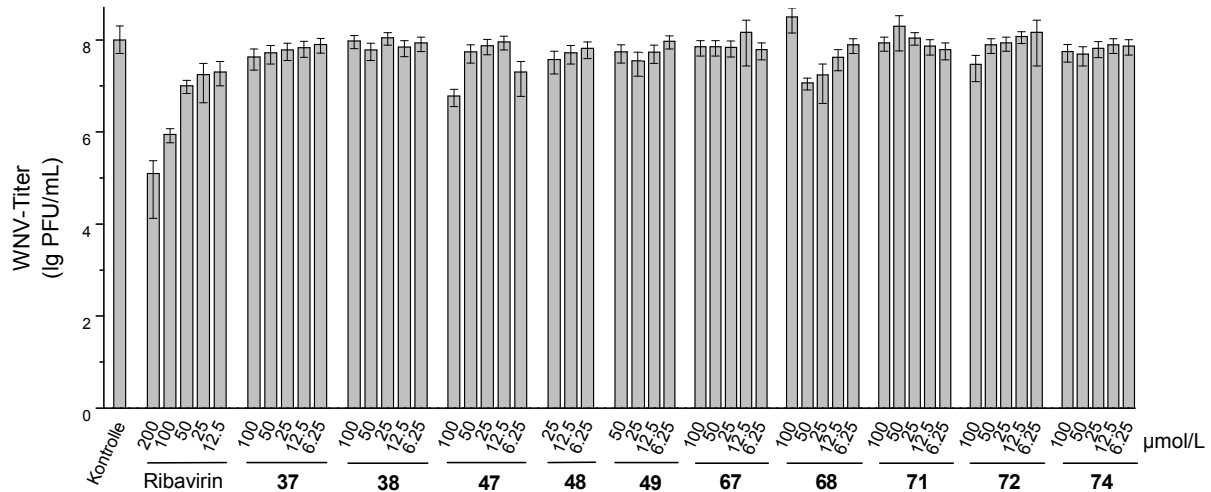


Abbildung 38: Auswirkung ausgewählter Furininhibitoren auf die Ausbreitung des WNV in Huh7-Zellen. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kouretova et al., 2017). Huh7-Zellen wurden mit Inhibitoren variierenderer Konzentrationen inkubiert und mit WNV infiziert (MOI 0.2). Nach 24 h wurde der jeweilige Überstand des Zellmediums gesammelt und der Virus-Titer in VeroE6-Zellen mittels eines *plaque assay* bestimmt.

Die antiviralen Aktivitäten des wirksamsten P1-modifizierten Inhibitors **76** mit dem Fluor-substituierten 4-Amba-Rest und des P2-Lys-Derivates **106** wurden jeweils gegen DENV-2 und WNV untersucht (**Abbildung 39**). Wie erwartet zeigte der Inhibitor **4** auch in diesen zwei Experimenten den stärksten Effekt: Eine Konzentration von 50 µmol/L bewirkte eine etwa 1000-fache Reduktion des jeweiligen Virus-Titers. Im Vergleich dazu war die Wirksamkeit des P2-Lys-Derivates **106** etwas schwächer, jedoch immer noch im selben Bereich. Eine niedrigere, aber dennoch signifikante Hemmung der Virusausbreitung wurde auch für den Inhibitor **76** beobachtet. Die Aktivität dieses Inhibitors ist bei vergleichbaren Konzentrationen ähnlich zur Ribavirin-Wirkung.

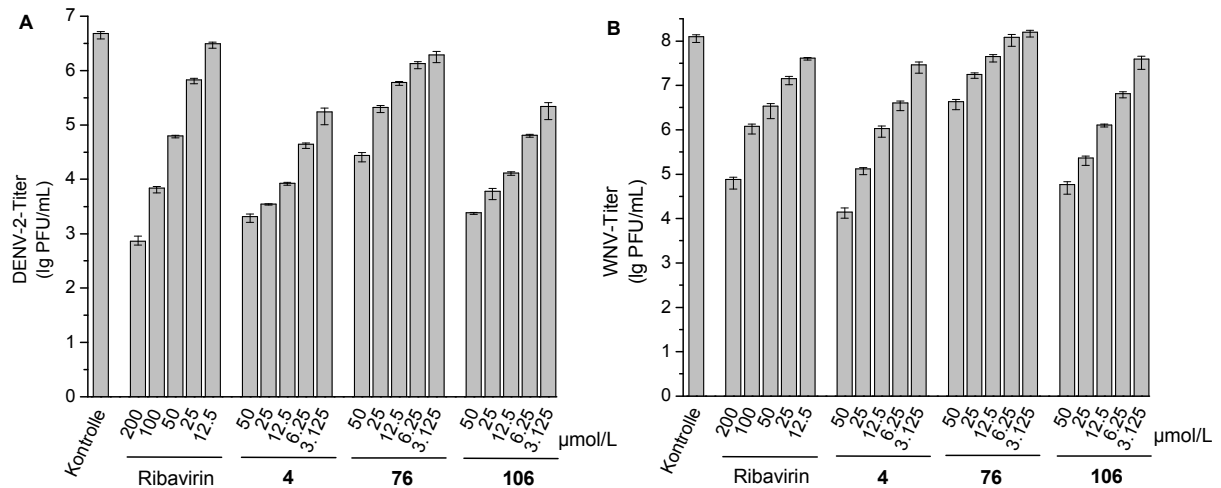


Abbildung 39: Auswirkung ausgewählter Furininhibitoren auf die Ausbreitung von DENV-2 (A) und WNV (B) in Huh7-Zellen. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kouretova et al., 2017). Huh7-Zellen wurden mit Inhibitoren variierender Konzentrationen inkubiert und mit DENV-2 (MOI 1) bzw. WNV (MOI 0.2) infiziert. Nach 24 h wurde der jeweilige Überstand des Zellmediums gesammelt und der Virus-Titer in VeroE6-Zellen mittels eines *plaque assay* bestimmt.

Wie bereits erwähnt, ist die NS2B-NS3-Protease der Flaviviren ein wichtiger Pathogenitätsfaktor und eignet sich somit als Target für die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe (Lim and Shi, 2013; Luo et al., 2015). Das NS3-Protein ist ein Enzym mit mehreren Funktionen. Die *N*-terminale Domäne ist eine Serinprotease, die *C*-terminale Domäne fungiert als RNA-Helicase, Nukleosid-Triphosphatase und RNA 5'-Triphosphatase. Um als katalytisch aktives Enzym wirken zu können, braucht die NS3-Protease den Cofaktor NS2B. Dieses Protein ist in der Membran des ER verankert und über eine zytosolische Domäne mit der NS3-Protease nichtkovalent verbunden, demzufolge ist die proteolytische Aktivität der Flavivirus-Protease auf der zytosolischen Seite am ER lokalisiert. In den letzten Jahren wurde von mehreren NS2B-NS3-Proteaseinhibitoren berichtet.

Ähnlich wie Furin, spaltet die NS2B-NS3-Protease ihre natürlichen Substrate bevorzugt hinter einem, meistens aber hinter zwei basischen Resten (Chambers et al., 1990). Einige der neu synthetisierten Furininhibitoren wurden als Inhibitoren der NS2B-NS3-Protease des ZIKV getestet (**Abbildung 40**). Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld (Universität Lübeck) nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Lei et al., 2016).

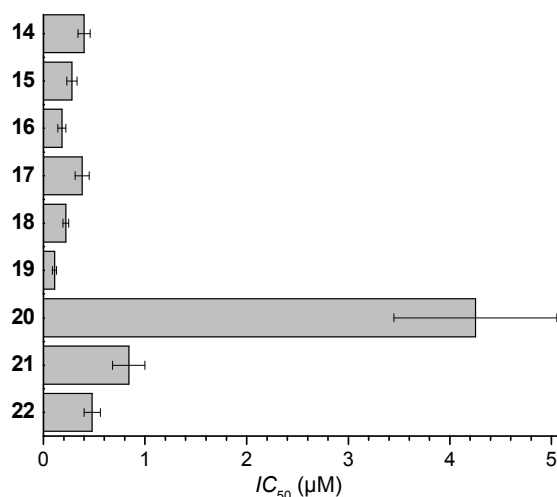


Abbildung 40: Hemmung der ZIKV NS2B-NS3^{pro} durch zyklische Furininhibitoren. Die IC_{50} -Werte wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld nach einer bereits beschriebenen Methode bestimmt (Lei et al., 2016).

Obwohl es schon 1947 isoliert wurde (Dick et al., 1952), blieb ZIKV in den folgenden etwa 70 Jahren der breiten Öffentlichkeit unbekannt (Petersen et al., 2016). Erst in den letzten Jahren wurde das Flavivirus als ernsthafte Gefahr für die menschliche Gesundheit weltweit angesehen (Petersen et al., 2016; Saiz et al., 2016). Trotz der relativ mild verlaufenden Erkrankung, die mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Hautausschlag, Arthralgien und Konjunktivitis gekennzeichnet ist, kann eine ZIKV-Infektion zu schwerwiegenden Spätfolgen führen. Zum einen sind ZIKV-Infektionen mit neurologischen Komplikationen wie Guillain-Barre-Syndrom assoziiert. Zum anderen wurde die mütterliche Infektion mit dem Virus eindeutig mit schweren Anomalien des Neugeborenen wie Mikrozephalie in Zusammenhang gebracht. Zur Zeit existieren keine spezifischen Maßnahmen zur Therapie oder Prävention einer ZIKV-Infektion. Die zelluläre Konvertase Furin sowie die virale NS2B-NS3-Protease können aber geeignete Targets für die Wirkstoffentwicklung sein.

Vor Kurzem wurde eine Kristallstruktur der ZIKV-NS2B-NS3-Protease in Komplex mit einem Boronsäurederivat publiziert (Lei et al., 2016). Für diesen Inhibitor wurde ein IC_{50} -Wert von 0.25 µM bestimmt. Aus der Kristallstruktur wird ersichtlich, dass die basischen P1-Arginin- und P2-Aminomethylphenylalanin-Reste mehrere polare Wechselwirkungen im aktiven Zentrum der Protease ausbilden. Es ist also nicht überraschend, dass die multibasischen Furininhibitoren die virale Protease ebenfalls mit IC_{50} -Werten in diesem Bereich hemmen (**Abbildung 40**). Dabei sind die spezifischen zyklischen Furininhibitoren **14-19** mit 4-Amba in P1-Position wirksamer als die Oligoarginine **20-22**. Auffällig ist auch, dass sowohl die spezifischen Furininhibitoren als auch die Referenzverbindungen mit jeweils mehr Arginin-Resten und dementsprechend größeren Ringen

eine wirksamere Hemmung im Vergleich zu den kleineren Zyklen aufweisen. Diese Tendenz lässt sich möglicherweise mit der relativ hohen Spannung der kleineren Ringe erklären, die die Bindung erschwert.

3.4.4 Diphtherietoxin

Als Erreger der akuten, ansteckenden Infektionskrankheit Diphtherie wurde 1884 das *Corynebacterium diphtherie* erkannt (Pappenheimer, 1977). Das ist ein grampositives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium (Riegel et al., 1995), das durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen übertragen wird (Hadfield et al., 2000). Es wurde bisher sowohl in Menschen als auch in Rindern und Pferden gefunden (Collier, 1975). Im Falle einer Infektion kommt das Bakterium normalerweise nur im oberen Respirationstrakt vor. Die Infektion kann subklinisch verlaufen. In anderen Fällen können aber die Erreger die Oberflächenschichten des Nasopharynx und der oberen Trachea durchdringen. Es kommt zur Bildung einer für das Krankheitsbild sehr typischen Pseudomembran. Seltener werden Infektionen der Haut (z.B. Wundinfektionen) mit *Corynebacterium diphtheriae* beobachtet.

Im Laufe der akuten Erkrankung kann es aufgrund der Pseudomembranbildung und Schwellungen zur Verengung der Atemwege kommen, was zur Zyanose oder sogar Erstickung des Patienten führen kann (Collier, 1975; Hadfield et al., 2000). Gefährlicher sind jedoch Komplikationen, die distale Organe betreffen. Dazu zählen Myokarditis bis hin zur akuten Herzinsuffizienz sowie Neuropathien.

Zuständig für das Krankheitsbild ist ein durch das Bakterium freigesetztes Exotoxin. Das Bakterienwachstum ist zwar auf Oberflächenepithelien begrenzt, das Diphtherie-Toxin (DT) wird aber in das Blut aufgenommen, gelangt dadurch zu verschiedenen Organen und kann letztendlich zu den beschriebenen schwerwiegenden systemischen Komplikationen führen (Collier, 1975; Hadfield et al., 2000). Eine bestehende Immunität gegen das Toxin gewährleistet einen sicheren Schutz gegen die schweren Symptome der Infektion. Dank der verfügbaren Impfung ist die Inzidenz der Diphtherie in vielen Ländern drastisch zurückgegangen, in einigen Gebieten ist die Erkrankung aber immer noch ein Problem.

Das DT ist ein Protein, das aus den zwei Fragmenten A und B besteht (Pappenheimer, 1977). Diese sind durch eine Peptidbindung und eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Das C-terminale Fragment B ist für die Bindung des intakten Toxins an den entsprechenden Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche zuständig. Durch Endozytose wird das Toxin anschließend in die Wirtszelle aufgenommen. Im sauren Milieu des Endosoms, aber zum Teil auch noch an der

Zelloberfläche, wird das DT durch Furin oder eine furinähnliche Protease in die zwei Fragmente gespalten (Tsuneoka et al., 1993). Die proteolytische Prozessierung erfolgt an der polybasischen Sequenz R190-VRR↓S194, wobei der Pfeil die Spaltstelle kennzeichnet (Chiron et al., 1994; Tsuneoka et al., 1993). Die Transmembran-Domäne des B-Fragments bildet eine Pore in der Endosomenmembran und ermöglicht dadurch den Transport des A-Fragments in das Zytosol. Dort wird die Disulfidbrücke durch Reduktasen gespalten und das enzymatisch wirksame Fragment A endgültig freigesetzt. Dieses katalysiert die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 und hemmt dadurch die Proteinbiosynthese der Wirtszelle.

Es wurde bereits gezeigt, dass Zellen mit ausbleibender endogener Furinproduktion resistent gegen intaktes Diphtherietoxin sind. In diesen Zellen findet die proteolytische Aktivierung des Toxins nicht statt (Tsuneoka et al., 1993). Furininhibitoren könnten demzufolge einen Schutz gegen die Auswirkungen des Toxins bieten. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Furininhibitoren auf ihre Schutzwirkung gegen intaktes DT untersucht (**Abbildung 41**). Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kirsten Sandvig (Universitätsklinik Oslo) nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2015).

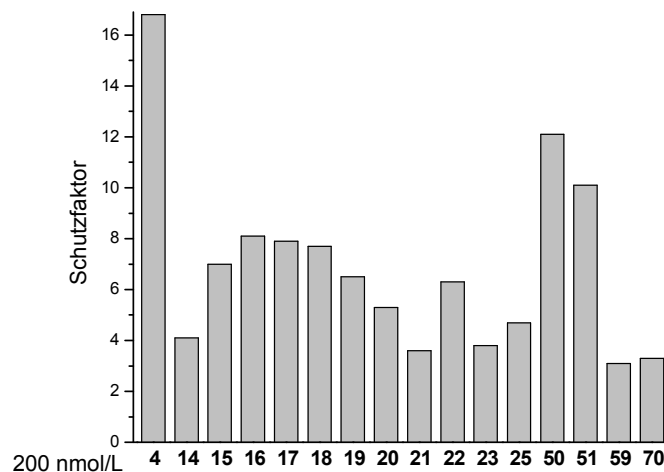


Abbildung 41: Schutzwirkung ausgewählter Furininhibitoren gegen Diphtherietoxin auf Vero-Zellen. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kirsten Sandvig nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Harden et al., 2015). Vero-Zellen wurden in Leucin-freiem Medium mit den Inhibitoren in einer Konzentration von jeweils 200 nmol/L für 30 min inkubiert. Anschließend wurde intaktes DT in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Nach 3 h wurde das Zellmedium durch ein ^3H -Leucin-haltiges Medium ersetzt und die Zellen darin für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gelöst, und die Radioaktivität wurde gemessen. Der Einbau des radioaktiven ^3H -Leucins korreliert mit der Zellviabilität.

Im Rahmen dieser Experimente wurde der sogenannte Schutzfaktor der Inhibitoren bestimmt. Dieser ist das Verhältnis zwischen den Toxinkonzentrationen in Gegenwart eines Inhibitors und einer Kontrolle ohne Inhibitor, die zu einem 50-prozentigen Zelltod führen.

Aus **Abbildung 41** wird ersichtlich, dass auch in diesem Experiment die stärkste Wirkung durch die Referenzverbindung **4** verursacht wird. Mit einem Schutzfaktor von jeweils 12 und 10 zeigen die *N*-terminal verlängerten pikomolaren Furininhibitoren **50** und **51** ebenfalls einen deutlichen Effekt gegen das DT. Mit Ausnahme der Verbindung **14** sind die restlichen zyklischen 4-Amba-Furininhibitoren im Vergleich zum Derivat **4** etwa halb so wirksam. Noch etwas schwächer ist im Durchschnitt die Schutzwirkung der linearen und zyklischen Oligoarginine. Der relativ hohe Schutzfaktor des zyklischen Dekarginins **22** sowie die relativ geringe Wirksamkeit der Verbindung **14** sind wahrscheinlich durch Messungenauigkeiten bedingt. Die P1-modifizierten Inhibitoren **59** und **70** hemmen die Toxinaktivierung durch Furin kaum.

3.5 Toxizitätsstudien

Die von Dr. Kornelia Harges synthetisierte und charakterisierte Verbindung **4** ist der weltweit wirksamste bisher bekannte Furininhibitor, dessen Wirksamkeit auch in mehreren Zellkulturversuchen nachgewiesen wurde. Der Furininhibitor reduziert deutlich die Toxizität der Anthrax- und Diphtherie-Toxine und hemmt die Ausbreitung einiger furinabhängiger hochpathogener Influenzaviren, Alphaviren und Flaviviren (**Kapitel 3.4**) (Harges et al., 2015; Harges et al., 2017). Zur starken Furinbindung tragen alle vier basischen Gruppen bei, vor allem aber der 4-Amba-P1-Baustein, der die S1-Tasche optimal ausfüllt (Harges et al., 2015).

Der 4-Amba-Baustein wurde später auch bei der Entwicklung von Furin- und PACE4-Inhibitoren in der Arbeitsgruppe von Robert Day benutzt (Gagnon et al., 2014; Kwiatkowska et al., 2016; Kwiatkowska et al., 2014). Für diese Verbindungen wurde bereits eine erhöhte Toxizität in Mäusen im Vergleich zu den analogen Derivaten mit Argininamid oder 2,3-Dehydroagmatin in P1-Position festgestellt (Kwiatkowska et al., 2016). Die maximal tolerierbare Dosis (MTD) für die am besten verträgliche 4-Amba-Verbindung (die auch im Rahmen dieser Doktorarbeit nachsynthetisiert wurde, Verbindung **48**) nach intravenöser Gabe betrug etwa 10 mg/kg (Kwiatkowska et al., 2016).

Obwohl sich die Verbindung **4** bisher in allen Zellkulturuntersuchungen als nicht zytotoxisch erwies, zeigte sie in einer weiter unten beschriebenen *in vivo*-Studie eine deutlich ausgeprägte Toxizität in Mäusen. Es wird vermutet, dass diese Toxizität u.a. mit dem stark basischen Charakter der Verbindung zusammenhängt, wie bereits für ähnliche Verbindungen postuliert (Gagnon et al., 2014; Kwiatkowska et al., 2016). Um dies genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen einer zweiten *in vivo*-Studie drei strukturell verwandte Derivate geprüft, die einen neutralen P5- (**2**) oder P1-Rest (**70**) oder den weniger stark basischen P2-Lys-Rest anstelle des Arg (**106**) besitzen.

Es ist seit Langem bekannt, dass mehrere polykationische Verbindungen toxische Effekte in Säugetieren hervorrufen, besonders in hohen Dosen. Die unspezifischen Nebenwirkungen variieren von Kreislaufzusammenbruch (akuter Blutdruckabfall) über kardiale Arrhythmien bis hin zu pseudoallergischen Reaktionen. Obwohl diese Effekte detailliert beschrieben und mehrmals verifiziert worden sind, sind die genauen physiologischen Mechanismen hinter den meisten Reaktionen zur Zeit nur unvollständig geklärt.

Eine übliche Nebenwirkung Benzamidin-haltiger Thrombininhibitoren ist akute Hypotonie (Kaiser et al., 1987; Peternel et al., 2006). Mehrere Derivate wurden in Mäusen und Ratten untersucht, um die Nebenwirkungen dieser Substanzklasse zu analysieren (Kaiser et al., 1987). Die Mäuse verstarben an respiratorischen Störungen, wobei sich die Bis-Benzamidin-Derivate als toxischer als die Mono-Benzamidine erwiesen und die Derivate ohne Benzamidin-Funktion am

besten verträglich waren. Ein rascher Blutdruckabfall wurde bei Ratten beobachtet. Dieser war irreversibel und im Falle der getesteten Bis-Amidine auch tödlich. Der Zusammenhang zwischen der stark basischen Benzamidin-Funktion und den toxischen Effekten *in vivo* wurde in mehreren Fällen bestätigt. Weniger basische Gruppen anstelle des Benzamidins – z.B. Aniline, Benzylamine, aber sogar Benzylguanidine – hatten einen signifikant geringeren Einfluss auf den arteriellen Blutdruck und waren generell besser verträglich.

Mehrere Mechanismen zur Erklärung des blutdrucksenkenden Effektes wurden postuliert, u.a. die Affinität des Amidinium-Kations zu unterschiedlichen zentralen und peripheren Rezeptoren. Eine agonistische Wirkung auf den Imidazolin-1-Rezeptor wurde für *p*-Aminobenzamidin beobachtet (Pallottini et al., 2002). Es wurde auch vermutet, dass Bis-Amidine und Guanidine einen antagonistischen Effekt auf die α -adrenergen Rezeptoren ausüben (Durant et al., 1970). Mögliche Mechanismen der Blockade adrenerger Neuronen durch Guanidine wurden auch diskutiert (Durant et al., 1970).

Andere relativ häufige Nebenwirkungen vieler kationischer Arzneistoffe sind verschiedene Arrhythmieformen, die durch die Blockade des hERG-Kanals hervorgerufen werden (Aronov, 2005). Das Vorhandensein eines positiv geladenen Stickstoffs führt zwar nicht zwangsläufig zur Blockade, erhöht aber stark die Wahrscheinlichkeit dafür, da der basische Rest über Kation- π -Interaktion an das Tyr652 im Kalium-Kanal binden kann. Es ist unklar, ob die ERG-Kanal-Blockade für die beobachteten Effekte in Mäusen und Ratten zuständig ist, da nur ein sehr schwacher (wenn überhaupt) hERG-ähnlicher Kalium-Strom in kardialen Myozyten von Ratten detektiert wurde (Wymore et al., 1997), obwohl neuere Untersuchungen das Gegenteil behaupten (McDermott et al., 2002; Pond and Nerbonne, 2001; Wymore et al., 1997). Außerdem weckt die ERG-Expression in anderen Geweben immer mehr Aufmerksamkeit (Babcock and Li, 2013). Die Verteilung von ERG-mRNA in zahlreichen Geweben ist ein Indiz dafür, dass der ERG-Kanal eine wichtige Rolle in einer Reihe von Erkrankungen spielen kann und dass die Blockade dieses Kanals unterschiedliche Nebenwirkungen auslösen kann. Die Interaktion mit dem hERG-Kanal ist also letztendlich ein Aspekt, der während jeder Wirkstoffentwicklung berücksichtigt werden sollte (Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006).

Polybasische Verbindungen können in vielen Fällen auch nichtimmunologische Hypersensitivitätsreaktionen („Pseudo-Allergien“) auslösen (Pernel et al., 2006; Wang et al., 2011). Durch IgE-unabhängige Mechanismen verursachen sie direkte Mastzelldegranulation und folglich Allergie-ähnliche Symptome wie Hautausschlag, Pruritus, aber auch respiratorische Störungen, Herzrhythmusstörungen, Hypotonie oder Anaphylaxie bis hin zum Tode. Eine denkbare Erklärung für diesen Effekt ist eine Aktivierung von G-Proteinen. Die daran gekoppelten

Rezeptoren lösen durch Stimulation von Phospholipasen (PL) wie PLA₂ und/oder PLC verschiedene Signalkaskaden aus. Diese haben die Freisetzung von Mediatoren wie Neurotransmittern (Histamin, Serotonin), proteolytischen Enzymen (Trypsin), Prostaglandinen, Leukotrienen, Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) und Cytokinen zur Folge. Zur Toxizität der polykationischen Peptide könnte auch ihre Ähnlichkeit zu zellkerngerichteten eukariotischen Signalpeptiden beitragen (Hancock and Sahl, 2006).

Die früher durchgeführten Toxizitätsstudien gaben Anlass, das toxikologische Profil der Verbindung **4** und anschließend drei weiterer Derivate mit reduzierter Basizität zu untersuchen. Die Toxizitätsuntersuchungen wurden von der Firma Eurofins Panlabs Taiwan *Ltd.* nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die Auswirkungen beobachtet, die nach intraperitonealer (*i.p.*) Applikation der jeweiligen Verbindungen in ICR-Mäusen auftraten. Die Versuche wurden an Gruppen von jeweils vier erwachsenen Mäusen, bestehend aus zwei weiblichen und zwei männlichen Tieren, durchgeführt. Jede Gruppe wurde mit einer bestimmten Konzentration eines Inhibitors behandelt. Wenn alle vier Tiere aus der Gruppe den Zeitraum von 24 h nach der *i.p.*-Applikation überlebten, wurden dieselben Tiere mit der nächsthöheren Dosis des gleichen Inhibitors behandelt. Das Experiment wurde für den entsprechenden Inhibitor beendet, sobald mindestens ein Tier aus der Gruppe gestorben war. Alle Inhibitoren wurden für die Toxizitätsstudien als Hydrochloride bereitgestellt. Die Dosierungen wurden auf Grundlage der freien Basen der jeweiligen Inhibitoren berechnet, die Letzteren dann in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und in einem Volumen von 5 mL/kg *i.p.* verabreicht. Die wiederholte *i.p.*-Gabe von physiologischer NaCl-Lösung unter den gleichen Bedingungen wurde ohne Nebenwirkungen vertragen und diente als Kontrolle.

Die Ergebnisse beider Studien sind in **Tabelle 15** zusammengefasst. Die erste Studie begann mit dem Inhibitor **110** (das Hydrochlorid-Salz des Inhibitors **4**) in einer Dosis von 1 mg/kg, die keine Nebenwirkungen in den behandelten Tieren auslöste. Die nächsthöhere Dosis von 2.5 mg/kg wurde auch vertragen. Allerdings wurden 1 h nach Applikation der dritten Dosis von 5 mg/kg deutliche neurologische und autonome Störungen wie Ataxie, muskuläre Verspannungen, Hypothermie und/oder Ödeme beobachtet, die letztendlich zu einer Mortalität von 75 % führten. Als MTD für den Inhibitor **110** wurde also die Dosis von 2.5 mg/kg festgelegt.

Tabelle 15: Toxizitätsstudien in Mäusen, die von der Firma Eurofins Panlabs Taiwan *Ltd.* durchgeführt wurden. Die entsprechenden Verbindungen in den angegebenen Konzentrationen wurden als Hydrochloride in Gruppen von jeweils vier Mäusen intraperitoneal appliziert.

Nr.	Tolerierte Dosis (mg/kg)	Anzahl der Todesfälle bei der nächsthöheren Dosis
4 (TFA) = 110 (HCl)	2.5	4 von 4 bei 5 mg/kg
2 (TFA) = 111 (HCl)	10	3 von 4 bei 15 mg/kg
70 (TFA) = 112 (HCl)	10	1 von 4 bei 15 mg/kg
106 (TFA) = 113 (HCl)	5	4 von 4 bei 10 mg/kg

Aus diesem Grund starteten die Untersuchungen der anderen drei Inhibitoren in der Folgestudie direkt mit einer Dosis von jeweils 2.5 mg/kg, die durchweg gut vertragen wurde. Auch in der nächsthöheren Stärke von 5 mg/kg führte keiner der getesteten Inhibitoren zu Todesfällen. Lediglich milde Nebenwirkungen wie Muskelverspannungen und Piloerektion wurden beobachtet. Die Gabe von jeweils 10 mg/kg der Verbindungen **111** (das Hydrochlorid des Inhibitors **2** mit neutralem P5-Rest) und **112** (das Hydrochlorid des Inhibitors **70** mit neutralem P1-Rest) verursachte etwas stärker ausgeprägte, vorübergehende neurologische Symptome und autonome Änderungen, die nur über die ersten zwei Stunden nach der Applikation beobachtet wurden. Allerdings verstarben alle vier Tiere aus den entsprechenden Gruppen innerhalb der ersten 10 min nach der Verabreichung von 10 mg/kg des Inhibitors **113** (das Hydrochlorid des Inhibitors **106** mit einem Lysin in P2-Position). Bei einer Dosierung von jeweils 15 mg/kg verstarben drei von vier Tieren nach Behandlung mit dem Inhibitor **111** und nur eine Maus aus der Gruppe nach Behandlung mit dem Inhibitor **112**. Die überlebenden Mäuse zeigten weiterhin Symptome wie Ataxie, muskuläre Verspannungen und Piloerektion.

Die anschließenden Nekroskopien zeigten keine auffälligen Anomalien. Es soll noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass alle Todesfälle innerhalb der ersten Stunde nach Applikation festgestellt wurden. Dies deutet eher auf eine akute als auf eine chronische Toxizität hin, obwohl ein Beobachtungszeitraum von 24 h viel zu kurz ist, um zuverlässige Schlussfolgerungen über Langzeit-Effekte zu erlauben.

Der stark basische Charakter des Benzamidin-Inhibitors **4** trägt offenbar zum relativ ungünstigen toxikologischen Profil dieser Verbindung bei. Dafür spricht die Tatsache, dass sich die Toxizität durch alle drei basizitätsverringenden Modifikationen des Moleküls reduzieren lies. Das Derivat **70** mit fehlendem P1-Benzamidin verursachte in gleicher Konzentration weniger Todesfälle und erwies sich folglich als etwas weniger toxisch im Vergleich zur Verbindung **2** mit fehlendem Guanidin in Position P5. Dieses Ergebnis lässt schließen, dass die Benzamidin-Funktion

etwas stärker als das Guanidin zur Toxizität beiträgt, und stimmt mit früheren Beobachtungen überein (Gagnon et al., 2014; Kaiser et al., 1987; Kwiatkowska et al., 2016). Aber auch der Austausch des aliphatischen P2-Guanidins gegen ein aliphatisches Amin (Verbindung **106**) verbesserte die Verträglichkeit.

Einige Benzamidin-Verbindungen verursachen zwar bewiesenermaßen Nebenwirkungen, die sogar noch ausgeprägter für Bis-Benzamidin-Derivate sind (Kaiser et al., 1987), andere Benzamidine werden dagegen mit sehr hohen täglichen Dosen in Mäusen problemlos toleriert (z.B. Benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4-Amba, *i.p.* 100 mg/kg (Henneke et al., 2010)). Außerdem gibt es einige zugelassene Wirkstoffe, die diese funktionelle Gruppe enthalten. Einige Beispiele sind das Antiprotozoikum Pentamidin sowie die direkten Thrombininhibitoren Melagatran und Dabigatran, die als *prodrugs* (Ximelagatran und Dabigatranetexilat) verabreicht werden, obwohl Ximelagatran inzwischen wieder vom Markt genommen wurde. Da die Hemmwirkung des Inhibitors **4** durch keinerlei Modifikationen des P1-Restes erreicht werden konnte (**Kapitel 3.2.2.6**), sollte dieser Baustein bei der weiteren Strukturoptimierung erst einmal beibehalten werden. Der P5-Guanidinomethyl-Substituent ist für eine signifikante Furinhemmung auch sehr wichtig und kann nach bisherigem Wissen nur durch den Aminomethyl-Rest zum Teil ersetzt werden. Auch der Austausch des Arginins gegen ein Lysin in P4-Position führt zu einer dramatischen Reduktion der Furinhemmung (Becker et al., 2011). Dagegen beeinflusst der Einbau eines Lysins in P2-Position die Hemmwirkung nur wenig (Verbindung **106**) und führt gleichzeitig zu einer merklichen Verminderung der Toxizität. Somit ist die Verbindung **106** eine erfolgreiche Weiterentwicklung des bekannten Furininhibitors **4**.

Das stark basische Benzamidin kann in Form eines Benzhydroxyamidins als *prodrug* maskiert werden. Diese Strategie wurde beim Thrombininhibitor Ximelagatran zwecks Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit angewendet. Ein weiterer Vorteil der *prodrugs* könnte aber auch das langsamere Anfluten der Inhibitormenge im Blut sein. Die Vermeidung plötzlich auftretender hoher Plasmaspiegel könnte das toxikologische Profil eines Arzneistoffes positiv beeinflussen. Die Verbindungen **73** und **108** sind Benzhydroxyamidin-Analoga der 4-Amba-Inhibitoren **4** und **106**. Ob diese Derivate tatsächlich im Körper zu den eigentlichen Wirkstoffen umgesetzt werden und als *prodrugs* fungieren und ob sie die Toxizität der bereits untersuchten Inhibitoren reduzieren könnten, muss erst noch im Rahmen weiterer Studien geprüft werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Furin ist eine Proproteinkonvertase, deren physiologische Aufgabe in der Prozessierung lebensnotwendiger Vorläuferproteine (Proproteine) besteht. Andererseits ist die Furinaktivität auch mit unterschiedlichen pathologischen Prozessen assoziiert. Dazu zählen einige Krebsarten, diverse Stoffwechselerkrankungen sowie verschiedene bakterielle und virale Infektionen. Daher ist Furin ein interessantes Zielmolekül für die Entwicklung entsprechender Arzneistoffe.

4.1 Synthese und Enzymkinetik

Anlehnend an die multibasische Furinerkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv -Arg-Xaa-Arg/Lys-Arg↓ und basierend auf früheren Promotionsarbeiten (Becker, 2011; Harges, 2014) wurden neue fluorogene Substrate und substratanaloge Inhibitoren des Furin hergestellt. Alle Verbindungen wurden durch eine Kombination aus Festphasen- und Lösungssynthese erhalten.

4.1.1 Substrate

Das von Dr. Gero Becker hergestellte AMC-Substrat **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) besitzt eine Spezifitätskonstante ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert) von etwa 115 000 L/mol·s. Durch Modifikationen der P2-, P3- und P5-Reste dieser Verbindung ist es gelungen, deutlich sensitivere Furinsubstrate zu erhalten. Alle neu dargestellten Derivate weisen höhere $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte als die Ausgangsverbindung **7** auf. Interessanterweise führt der Austausch des P2-Arg durch Lys zu einer Erniedrigung und der Ersatz des P3-Val durch Tle zu einer Erhöhung des K_{M} -Wertes. Dagegen haben Furininhibitoren mit P2-Lys meistens höhere und mit P3-Tle niedrigere K_{i} -Werte im Vergleich zu den analogen P2-Arg bzw. P3-Val-Verbindungen. Diese gegenläufigen Tendenzen bei der Beeinflussung der K_{M} - und K_{i} -Werten verdeutlichen, dass der K_{M} -Wert nicht als simple Dissoziationsgleichgewichtskonstante des ES-Komplexes angesehen werden darf.

Je höher die Spezifitätskonstante eines Substrats ist, d.h., je effizienter dieses Substrat durch das Enzym umgesetzt wird, desto sensitiver ist die enzymkinetische Messung. Dies erlaubt eine sparsamere Anwendung von Substrat und Enzym, ermöglicht aber auch z.B. die Messung sehr wirksamer Inhibitoren unter klassischen, nicht-*tight-binding*-Bedingungen. Eine solche Messmethode wurde mithilfe des neuen Substrats **12** (Ac-Arg-Arg-Tle-Arg-Arg-AMC) etabliert. Dadurch war es erstmals möglich, einige früher charakterisierte *tight-binding*-Inhibitoren unter klassischen Bedingungen neu zu vermessen und deren K_{i} -Werte zu bestätigen.

Die Kombination aus P2-Lys und P3-Tle führte zu der höchsten Spezifitätskonstante in der Serie der P5-Phac-Substrate (Verbindung **10**, Phac-Arg-Tle-Lys-Arg-AMC). Der Einbau einer basischen

P5-Gruppe in dieses Derivat (z.B. Ac-Arg-Arg-Tle-Lys-Arg-AMC) könnte ein noch effizienteres Substrat liefern. Ob sich die kinetischen Messungen dadurch weiter optimieren lassen, muss im Rahmen zukünftiger Arbeiten untersucht werden.

4.1.2 Inhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gruppen substratanaloger peptidomimetischer Furininhibitoren synthetisiert und charakterisiert.

4.1.2.1 Zyklische Inhibitoren

Basierend auf einem bereits publizierten zyklischen Grundgerüst, das ausgeprägte zellpenetrierende Eigenschaften aufweist (Qian et al., 2013), wurden durch gezielte Modifikationen spezifische Furininhibitoren hergestellt. Alle diese Derivate zeigen mit K_i -Werten im subnanomolaren Bereich eine sehr starke Hemmwirkung, wobei die P2-Arg-Inhibitoren etwas wirksamer als die analogen P2-Lys-Verbindungen sind. Die potentesten Inhibitoren wurden unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen. Auch einige zyklische und lineare Oligoarginine wurden dargestellt. Diese hemmen Furin jedoch viel schwächer als die eigentlichen Inhibitoren, was auf spezifischere Wechselwirkungen der Letzteren hindeutet. Für einige der zyklischen Inhibitoren wurde zusätzlich die Hemmwirkung auf zwei weitere PCs untersucht. Die P2-Arg-Derivate hemmen PC1/3 etwas besser als die analogen P2-Lys-Verbindungen. Dagegen zeigen die P2-Lys-Hemmstoffe einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt gegen PC2 im Vergleich zu den Arg-Analoga.

4.1.2.2 C-terminal verlängerte Peptidderivate

Durch Einbau verschiedener spaltbarer oder unspaltbarer *linker* im P1-P1'-Bereich wurde das Grundgerüst der Verbindung **4** verlängert. Dadurch wurden Inhibitoren erhalten, die auch die gestrichene Seite des Furin adressieren. Der wirksamste Inhibitor aus dieser Serie (Derivat **38**) besitzt einen K_i -Wert von etwa 20 nM, wird aber durch Furin relativ rasch gespalten. Die Hemmkonstanten der effektivsten unspaltbaren Inhibitoren aus dieser Gruppe liegen bei ca. 0.5 μ M. Es wird ersichtlich, dass der Verlust des P1-4-Amba-Restes durch C-terminale Verlängerungen nach bisherigem Wissen nicht kompensiert werden kann.

4.1.2.3 Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette

Peptidderivate mit dem decarboxylierten Arg-Mimetikum 4-Amba in P1-Position sind die bisher wirksamsten bekannten Furininhibitoren weltweit. Durch Einbau eines zweiten 4-Amba-Restes in

die P3-Seitenkette wurde versucht, die Hemmwirkung weiter zu verbessern. Der entstandene Inhibitor **47** ist zwar nicht wirksamer als die P3-Val/Tle-Inhibitoren, besitzt aber auch einen K_i -Wert im pikomolaren Bereich. Zusätzlich wurde ein weiterer 4-Amba-Inhibitor mit einer Tetra-Leu-Sequenz in der Hauptkette (Derivat **48**) als Referenzverbindung nachsynthetisiert (Kwiatkowska et al., 2016) und dieses Tetra-Leu-Segment erstmals an die P3-Seitenkette (Derivat **49**) gekuppelt. Diese Verbindungen besitzen K_i -Werte im subnanomolaren Bereich. Die eingebaute Leu-Sequenz im Inhibitor **48** hat sich als relativ gut verträglich in *in vivo*-Toxizitätsstudien erwiesen. Ob das auch für den neuen Inhibitor **49** gilt, muss noch untersucht werden.

4.1.2.4 Derivate mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe

Die früher synthetisierte polybasische Verbindung H-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba ist ein *tight-binding*-Furininhibitor. Durch die Überführung der freien *N*-terminalen schwächer basischen Aminogruppe in ein stärker basisches Guanidin (Verbindung **50**) konnte die Hemmwirkung weiter gesteigert werden. Der Austausch des P5-Arg durch Ala (Verbindung **51**) wirkt sich wie erwartet ungünstig auf die Inhibitionskonstante aus (Hardes et al., 2017). Ob diese Modifizierung den Abbau peptidischer Strukturen durch Aminopeptidasen reduziert, wurde bisher noch nicht geprüft.

4.1.2.5 C-terminal verkürzte Peptidderivate

Diese Derivate wurden hergestellt, indem die C-terminalen Reste des Inhibitors **4** (4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba) schrittweise eliminiert wurden. Auf diese Weise wurde die Bedeutung jedes einzelnen Restes für die Bindungsaffinität untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Hemmwirkung, trotz der stark basischen P5-Gruppe, ohne den P1-4-Amba-Rest drastisch abgeschwächt wird. Bei der enzymkinetischen Charakterisierung einiger dieser Derivate wurde ein unerwarteter Bindungsmodus an Furin beobachtet, der von der klassischen kompetitiven Hemmung abweicht. Aus diesem Grund konnten für diese Verbindungen keine K_i -Werte ermittelt werden. Ihre enzymkinetische Charakterisierung erfolgte nur durch Bestimmung der IC_{50} -Werte.

4.1.2.6 Inhibitoren mit P1-Modifizierungen

Ein basischer P1-Rest ist für die starke Furinhemmung unerlässlich. Da die Ergebnisse mehrerer Studien auf toxische Eigenschaften der Benzamidin-Derivate hindeuten, wurde der 4-Amba-Rest der Verbindung **4** durch verschiedene, z.T. weniger basische P1-Bausteine ersetzt. Der P1-Benzylamin-Inhibitor **71** und das P1-Aminopyridin-Analogon **72** besitzen K_i -Werte von 2.5

bzw. 0.8 nM. Das Fluor-substituierte Benzamidin-Derivat **76** ist mit einem K_i -Wert von 22.3 pM der wirksamste Inhibitor aus dieser Serie.

Auch einige der P1-modifizierten Inhibitoren weisen einen abweichenden Bindungsmodus auf, der bereits bei einigen C-terminal verkürzten Derivate festgestellt wurde. Dieser wurde durch unterschiedliche mathematische Auswertungsmethoden genauer untersucht. Das beobachtete kinetische Verhalten lässt sich am besten durch das Modell der parabolischen kompetitiven Inhibition beschreiben, bei dem zwei Inhibitormoleküle an das Target binden können. Ob dies tatsächlich der Fall ist, könnte nur durch Kristallstrukturen dieser Inhibitoren im Komplex mit Furin untersucht werden.

4.1.2.7 Derivate mit Lysin in P2-Position

Da die 4-Amba-Verbindung **4** aufgrund ihres polybasischen Charakters möglicherweise toxisch ist, ihre starke Hemmwirkung jedoch von keinem der neuen Inhibitoren mit P1-Modifikation erreicht werden konnte, wurde die allgemeine Basizität dieses Derivates durch den Austausch des P2-Arg durch Lys reduziert (Verbindung **106**). Einige weitere P2-Lys-Derivate wurden als Referenzverbindungen für die enzymkinetischen Messungen oder für *in vivo*-Studien hergestellt. Die enzymkinetische Auswertung des Inhibitors **106** stellt ein besonderes Problem dar, da diese Verbindung sehr wirksam ist und unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen werden muss, aber auch einen abweichenden Bindungsmodus zeigt. IC_{50} -Werte sind jedoch für die Charakterisierung von *tight-binding*-Inhibitoren ungeeignet (Copeland, 2005). Die praktischen Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Inhibitor **106** Furin marginal schwächer als die Verbindung **4** hemmt.

4.2 HPLC-Stabilitätsprüfungen

Die Stabilität ausgewählter Furininhibitoren in Gegenwart von Furin wurde durch Inkubationsversuche mit anschließender HPLC-Analyse der Spaltprodukte untersucht. Die Experimente zeigten, dass C-terminal zur Spaltstelle verlängerte Peptide mit einer basischen Aminosäure (Arg) in P1-Position relativ schnell durch Furin gespalten werden. Es wurde außerdem noch gezeigt, dass die Abweichungen im Hemmmechanismus bestimmter Inhibitoren in keinerlei Korrelation mit ihrer Stabilität stehen.

4.3 Zellkulturversuche

Ausgewählte Furininhibitoren wurden Kooperationspartnern für die Durchführung verschiedener Zellkulturversuche bereitgestellt. Die zyklischen Furininhibitoren zeigen praktisch keinen Effekt

auf die Vermehrung des hochpathogenen Vogelinfluenzavirus A H7N1, der Alphaviren SFV und CHIKV und der Flaviviren DENV-2 und WNV sowie auf die Aktivierung des bakteriellen Diphtherie-Toxins (DT). Die zellpenetrierenden Eigenschaften des zyklischen Grundgerüsts verbessern die Aktivität der Furininhibitoren in Zellkulturen offenbar nicht. Der *tight-binding*-Inhibitor **50** hemmt dagegen sichtbar die Ausbreitung der getesteten Viren und zeigt auch eine Schutzwirkung gegen das DT, wobei diese Effekte deutlich schwächer als die Wirkung des bewährten Inhibitors **4** sind. Das Fluor-substituierte Benzamidin-Derivat **76** weist auch eine ausgeprägte hemmende Wirkung auf die Vermehrung von DENV-2 und WNV. In einem anderen *in vitro*-Experiment hemmt diese Verbindung die HA0-Spaltung des A H7N1-Virus fast genauso effektiv wie der Inhibitor **4**. Die inhibitorische Aktivität des P2-Lys-Derivates **106** auf die DENV-2- und WNV-Ausbreitung und auf die HA0-Spaltung ist ebenfalls vergleichbar mit der Aktivität der Referenzverbindung **4**.

4.4 Toxizitätsstudien

Die Verbindung **4** ist ein sehr wirksamer Furininhibitor, erwies sich jedoch in einer *in vivo*-Toxizitätsstudie als relativ schlecht verträglich. Es wird vermutet, dass die beobachteten toxischen Effekte nach *i.p.*-Applikation in Mäusen am polybasischen Charakter dieses Derivates liegen. Zwei strukturverwandte Derivate, mit neutralen Resten in P5- (**2**) oder P1-Position (**70**), weisen eine deutlich geringere Toxizität auf. Dabei ist die Verträglichkeit des sehr wirksamen Inhibitors **2** vergleichbar mit der des Derivates **70**, das Furin nur sehr schwach inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass die Toxizität nicht zwangsläufig mit der Stärke der Furinhemmung korreliert und daher wahrscheinlich durch andere Mechanismen ausgelöst wird.

Da das P1-Benzamidin für die Furinhemmung von essenzieller Bedeutung ist und auch in manchen zugelassenen Arzneistoffen enthalten ist, sollte die Struktur des Inhibitors **4** an anderen Stellen weiter modifiziert werden, um eine Verringerung der Toxizität unter Erhalt der Hemmwirkung zu erzielen. Eine erfolgreiche Weiterentwicklung ist das P2-Lys-Analogon **106**. Im Vergleich zur Verbindung **4** weist dieser Inhibitor eine ähnliche Aktivität *in vitro* auf und zeigte bereits eine bessere Verträglichkeit in Mäusen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Verwendete Materialien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland), Acros Organics (Geel, Belgien), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carbolution Chemicals GmbH (St. Ingberg, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Ferak Berlin GmbH (Berlin, Deutschland), Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Harze, Aminosäuren und deren Derivate sowie Kupplungsreagenzien stammen von den Firmen Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt, Deutschland), Bachem AG (Bubendorf, Schweiz), CBL, Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Deutschland), Novabiochem (Darmstadt, Deutschland), ORPEGEN Peptide Chemicals GmbH (Heidelberg, Deutschland), Pentapharm (Basel, Schweiz) und PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, Frankreich). Trockene Lösungsmittel zur Synthese wurden in hoher Qualität (Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „für die HPLC“) von den oben erwähnten Firmen erworben und ggf. über geeigneten Molsieben gelagert. Trockenes THF wurde mittels Lagerung und Destillation über KOH und anschließend über Natrium hergestellt. Technische Lösungsmittel stammen aus Hochschullieferungen. Für die analytische und präparative HPLC wurden Acetonitril (der Firmen VWR und Biosolve B.V. (Valkenswaard, Niederlande)) und Reinstwasser als Laufmittel verwendet. Das Reinstwasser wurde mittels einer NOWA pure select-Anlage (KSN Wassertechnik, Nistertal, Deutschland) erhalten. Die Trifluoressigsäure stammt aus einer Hochschullieferung der Firma Solvay. Puffer wurden mit Reinstwasser, andere wässrige Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Humanes Furin (Kacprzak et al., 2004), PC1/3 und PC2 wurden von Prof. Dr. Iris Lindberg (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA) bereitgestellt.

5.1.2 HPLC

Analytische HPLC 1

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle analytischen Chromatogramme (Reaktionskontrollen sowie Reinheitsprüfungen der Endstufen) an einer Shimadzu LC-10A-Anlage (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland), bestehend aus einem SCL-10AVP System Controller, einem SIL-10AXL Autoinjektor, einem SPD-M10AVP Diodenarray-Detektor, zwei

LC-10ATVP Pumpen, einem DGU-14A Entgaser und einem CTO-10A Säulenofen mit einer C18-Trennsäule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 4.6 \times 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland), aufgenommen. Als Laufmittel dienten Reinstwasser mit 0.1 % TFA (Laufmittel A, pH 1.88) und Acetonitril mit 0.1 % TFA (Laufmittel B). Dementsprechend wurde bei allen HPLC-Trennungen ein Gemisch aus beiden Laufmitteln (A und B) als mobile Phase verwendet. Je nach Hydrophilie/Hydrophobie der Verbindungen wurden die Läufe bei verschiedenen Konzentrationen des Laufmittels B gestartet und mit einem linearen Gradienten (1 % Anstieg des Laufmittels B pro Minute) und einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Statt durch Retentionszeit wurden die Verbindungen durch Angabe der MeCN-Konzentration (% B), bei der diese eluieren, charakterisiert. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Die Chromatogramme wurden mit der Software Shimadzu Class-VP Version 7.2.1 SP1 ausgewertet.

Analytische HPLC 2

Für die Stabilitätsprüfungen bestimmter Inhibitoren sowie für die Reinheitsuntersuchungen der Amidin-Hydroxyamidin-Paare wurde eine Shimadzu-Anlage (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland), bestehend aus einem CBM-20A System Controller, einem SIL-20A HT Autoinjektor, einem SPD-M20A Diodenarray-Detektor, einer LC-20AT Pumpe, einem DGU-20As Entgaser und einer C18-Trennsäule (EC Nucleodur C18 HTec, 5 μm , 110 \AA , 4 \times 125 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Der Hauptsäule ist eine C18-Vorsäule (EC Nucleodur C18 HTec, 5 μm , 3 \times 4 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) vorgeschaltet. Als mobile Phase für die Stabilitätsuntersuchungen diente ein Gemisch aus den oben beschriebenen Laufmitteln A und B, die auch für die HPLC 1 benutzt wurden. Für die Reinheitsuntersuchungen der Amidin-Hydroxyamidin-Paare wurden als Laufmittel A ein Ammoniumacetat-Puffer (20 mmol/L, pH 4.0, eingestellt durch Zugabe von HCl der Konzentration 2 mol/L) und als Laufmittel B pures Acetonitril verwendet. Für sämtliche Läufe wurde auch an dieser Anlage ein linearer Gradient (Anstieg von 1 % Laufmittel B pro Minute) mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Für die Auswertung der Chromatogramme wurde die Software LC Solution Version 1.23 SP1 verwendet.

Präparative HPLC

Für die Reinigung der Verbindungen wurde eine präparative HPLC-Anlage der Firma Varian (Pumpen: Prep Star Modell 218 Gradienten System, Detektor: Pro Star Modell 320, Fraktionskollektor: Varian Modell 701) mit einer C18 Trennsäule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 32 \times 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Als mobile Phase diente ebenfalls ein Gemisch aus den oben bei der HPLC 1 beschriebenen Laufmitteln A und B. Lediglich für die Reinigung der zwei kleinen Proben beider Hydroxyamidin-Inhibitoren (**73**,

Kapitel 3.1.7.5; 108, Kapitel 3.1.8) wurden als Laufmittel A ein Ammoniumacetat-Puffer (20 mmol/L, pH 4.0, eingestellt durch Zugabe von Eisessig) und als Laufmittel B pures Acetonitril verwendet. Für sämtliche Läufe wurde ein linearer Gradient (0.5 % Anstieg Laufmittel B pro Minute) mit einer Flussrate von 20 mL/min verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Standardmäßig konnte bei den Endstufen der Inhibitoren eine Reinheit von mindestens 95 % erzielt werden.

5.1.3 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigplatten (Alufolien beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma Merck verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Angaben über die verwendeten Laufmittel befinden sich in der Beschreibung der analytischen Daten der entsprechenden Verbindungen. Die angegebenen R_F -Werte bezeichnen das Verhältnis der Laufstrecke der Probe zur Laufmittelfront.

5.1.4 Lyophilisierung

Für die Gefriertrocknung der mittels präparativer HPLC gereinigten, in H₂O gelösten Verbindungen wurde die Anlage Alpha 2-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) verwendet. Nach der Lyophilisierung wurden die Verbindungen als TFA-Salze erhalten.

5.1.5 Massenspektrometrie

Die Massen der synthetisierten Verbindungen wurden mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie, Philipps-Universität Marburg, im ESI(+) oder ESI(-)-Modus bestimmt.

5.1.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die ¹H-, COSY-, TOCSY-, ¹³C- und ¹⁹F-Spektren wurden an einem ECX-400 oder ECA-500 (Jeol Inc., USA) am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie, Philipps-Universität Marburg, bei 400 (¹H) bzw. 101 (¹³C) bzw. 376 MHz (¹⁹F) oder 500 (¹H) bzw. 126 (¹³C) bzw. 471 MHz (¹⁹F) aufgenommen. Die Referenzierung erfolgte durch interne Lösungsmittelsignale. Nur die ¹⁹F-NMR-Spektren wurden extern mittels Trifluortoluen (-63.9 ppm) referenziert. Die Spektren der in DMSO-d₆ gelösten Verbindungen wurden bei 303 K, alle anderen bei RT aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm (*parts per million*), die Kopplungskonstanten J in Hz (Hertz) angegeben. Folgende Abkürzungen wurden für

die Multiplizitäten verwendet: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplett), td (Triplett vom Dublett), q (Quartett), dq (Dublett vom Quartett) und m (Multiplett). Die Bezeichnung der Multiplizitäten richtet sich nach dem Erscheinungsbild und entspricht nicht immer den erwarteten Signalen. Die NMR-Spektren wurden gemäß den Regeln erster Ordnung ausgewertet. Signale höherer Ordnung wurden als Multipletts angegeben. Falls möglich, erfolgte eine Zuordnung der bestimmten Signale entsprechend der Atomnummerierung in der angegebenen Strukturformel.

5.1.7 Peptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem Synthesizer (Syrro 2000, MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) in 2 mL-Spritzen (MultiSynTech) aus Polypropylen, versehen mit PTFE-Fritten. Die manuelle Variante wurde an einem Schüttler (Ika, Staufen, Deutschland) in 2-, 5- oder 10 mL-Spritzen durchgeführt, die ebenfalls von der Firma MultiSynTech bezogen wurden.

5.2 Synthese der Substrate und Inhibitoren

Sämtliche Inhibitoren wurden durch eine Kombination aus Festphasen- und Lösungssynthese hergestellt. Standardmäßig wurden die am Harz aufgebauten Zwischenstufen durch Kupplung niedermolekularer Bausteine oder durch andere Syntheseschritte in Lösung modifiziert. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, aus H₂O lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten. Die Reinheitsangaben beziehen sich auf die HPLC-Detektion bei 220 nm.

5.2.1 Allgemeine Vorschriften

5.2.1.1 Vorschrift A: Festphasenpeptidsynthese

Allgemeine Anmerkungen

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte nach einem Standard-Fmoc-Protokoll. Dabei wurde ein orthogonales Schutzgruppenprinzip mit der basenlabilen temporären *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und säurelabilen permanenten Seitenkettenschutzgruppen angewendet. Die verwendeten Fmoc-Aminosäurederivate sind in **Tabelle 16** aufgelistet.

Tabelle 16: Fmoc-Aminosäurederivate, verwendet bei der Festphasenpeptidsynthese. Die eingeklammerte Schutzgruppe befindet sich in der Seitenkette der entsprechenden Aminosäure. Alle Derivate sind L-konfiguriert, sofern nicht anders angegeben.

1-Buchstaben-Code ¹	3-Buchstaben-Code ¹	Aminosäurederivat	Molare Masse (g/mol)
A	Ala	Fmoc-Alanin-OH × H ₂ O	329.4
F	Phe	Fmoc-Phenylalanin-OH	387.4
G	Gly	Fmoc-Glycin-OH	297.3
K	Lys	Fmoc-Lysin(Boc)-OH	468.5
K	Lys	Fmoc-Lysin(Dde)-OH ³	532.6
L	Leu	Fmoc-Leucin-OH	353.4
P	Pro	Fmoc-Prolin-OH	337.4
R	Arg	Fmoc-Arginin(Pbf)-OH	648.8
S	Ser	Fmoc-Serin(tBu)-OH	383.4
V	Val	Fmoc-Valin-OH	339.4
Y	Tyr	Fmoc-Tyrosin(tBu)-OH	459.6
—	Tle	Fmoc- <i>tert</i> -Leucin-OH	353.4
l	DLeu	Fmoc-D-Leucin-OH ³	353.4
—	—	Fmoc-3-Aminomethylphenyllessigsäure-OH ³	387.4
—	—	Fmoc-4-Aminomethylphenyllessigsäure-OH ³	387.4
—	5-Ava	Fmoc-5-Aminovaleriansäure-OH	339.4
—	2-Nal	Fmoc-2-Naphthylalanin-OH ³	437.5
—	rOrn ²	Boc-Ornithin(Fmoc)-OH ³	454.5

¹der entsprechenden freien Aminosäure (ohne jegliche Schutzgruppen)

²r = *reversed*; das Ornithin wurde über die Seitenkette in das Peptidrückgrat eingebaut

³Aminosäurederivate, die bei den Kupplungen nur im 2.5-fachen Überschuss verwendet wurden

Automatisierte Synthese am Syro 2000

In 2 mL-Spritzen mit PTFE-Fritten wurden zunächst jeweils ca. 120 mg trockenes Harz eingewogen. Die Spritzen wurden im Synthesizer eingeordnet und das Programm gestartet. Die nachfolgende vorprogrammierte automatische Synthese verlief nach mehreren Zyklen, deren einzelne Schritte in **Tabelle 17** zusammengefasst sind. Die Aminosäurederivate wurden durch Doppelkupplungen an das Harz gekuppelt, wobei für diesen Schritt jeweils ein 4-facher Überschuss des entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäurederivats, des Additivs HOBt und des Kupplungsreagenzes HBTU sowie ein 8-facher Überschuss der Hilfsbase DIPEA verwendet wurde. Von den teuren Derivaten wurde ausnahmsweise nur ein 2.5-facher Überschuss eingesetzt (siehe **Tabelle 16**). Die Berechnung der eingesetzten Stoffmengen bezog sich standardmäßig auf die

initiale Harzbeladung, die entweder vom Hersteller angegeben war (bei kommerziell erworbenen Harzen) oder selbst bestimmt wurde (bei manuell beladenen Harzen). Nach Beendigung der automatisierten Synthese wurden die Harze sechsmal mit DMF gewaschen und direkt für weitere Modifikationen umgesetzt.

Tabelle 17: Programm des Synthesizer Syro 2000 zur automatisierten Festphasenpeptidsynthese.

Erster Zyklus				
Schritt	Aktion	Reagenzien	Wiederholungen	Zeit (min)
1	Quellen	DMF	2	10
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ¹	2	5+25
3	Waschen	DMF	7	1
4	Kupplung	Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA ²	2	120
5	Waschen	DMF	4	1

n-ter Zyklus				
Schritt	Aktion	Reagenzien	Wiederholungen	Zeit (min)
1	Waschen	DMF	2	1
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ¹	2	5+15 ³
3	Waschen	DMF	7	1
4	Kupplung	Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA ²	2	95
5	Waschen	DMF	4	1

¹im Verhältnis 1:1:1 (v/v/v), versetzt mit 1 % (w/v) Triton-X 100

²im Molverhältnis 4:4:4:8, bezogen auf die vom Hersteller angegebene maximale Harzbeladung oder – bei manuell beladenen Harzen – auf die selbstbestimmte Harzbeladung. Zur Kupplung wurden bei der automatisierten Festphasenpeptidsynthese in den 2 mL-Spritzen mit ca. 100 mg Harz jeweils 400 µL einer Fmoc-AS-Lösung (0.5 mol/L) mit äquimolarer Konzentration an HOBt in DMF, 400 µL einer HBTU-Lösung (0.5 mol/L) in DMF und 270 µL einer DIPEA-Lösung (1.5 mol/L) in NMP eingesetzt. Zum Kupplungsansatz wurden zusätzlich 130 µL einer Lösung aus Triton (2.4 g) und Ethylencarbonat (33 g) in DCM (aufgefüllt auf 40 mL) zugegeben, sodass eine Endkonzentration von ca. 1 % (w/v) Triton und 1 mol/L Ethylencarbonat im Ansatz resultierte (Zhang et al., 1994).

³ab dem 10. Zyklus: 20 min bei der zweiten Abspaltung

Manuelle Synthese

Analog zur automatisierten Festphasenpeptidsynthese erfolgte die manuelle Variante in 2, 5 oder 10 mL-Spritzen, auch versehen mit PTFE-Fritten, mit dem Unterschied, dass für die Fmoc-Abspaltung eine 20-prozentige Piperidin-Lösung in DMF verwendet wurde und anstelle der Doppelkupplungen nur Einzelkupplungen mit einer Reaktionszeit von 120 min erfolgten.

5.2.1.2 Vorschrift B: 2-Chlortritylchlorid-Harzbeladung mit Fmoc-Aminosäuren

Das eingewogene 2-Chlortritylchlorid-Harz (Herstellerangabe für die initiale Beladung: 1.60 mmol/g) wurde in ein Glasgefäß mit eingeschmolzener Sinterfritte überführt. Dazu wurden 1 eq des Fmoc-geschützten Aminosäurederivates, gelöst in trockenem DCM (1 mL pro 0.1 g Harz), und 4 eq DIPEA zugegeben und der Reaktionsansatz 2 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wurde das Harz 3×1 min mit trockenem DCM und anschließend noch 3×1 min mit einer Mischung aus trockenem DCM, trockenem MeOH und DIPEA (17/2/1, v/v/v, *capping*-Lösung) gewaschen. Zum Schluss wurde das Harz je 3×1 min mit DCM, DMF und erneut DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Die neue Harzbeladung wurde nach Vorschrift C bestimmt und bei den nachfolgenden Syntheseschritten berücksichtigt.

5.2.1.3 Vorschrift C: Bestimmung der Beladung von 2-Chlortrityl-Harzen

Photometrische Bestimmung

Die photometrische Bestimmung der Harzbeladung erfolgte durch Vermessung der Absorption des Fmoc-Piperidin-Abspaltproduktes (Dibenzofulven-Piperidin-Addukt) (Eissler et al., 2017).

Zunächst wurde der Absorptionskoeffizient (stark abhängig auch von der Piperidin-Konzentration) des Abspaltproduktes bei 301 nm bestimmt. Dafür wurde eine Fmoc-Gly-OH-Stammlösung in 20 % Piperidin/DMF (v/v) mit einer genau bekannten Konzentration hergestellt und 30 min bei RT aufbewahrt. Diese Zeit war ausreichend für die vollständige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Die aus der Stammlösung hergestellte Verdünnungsreihe des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes wurde im Photometer mithilfe einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) vermessen. Aus den Absorptionswerten bei den entsprechenden Konzentrationen wurde eine Kalibriergerade erstellt, deren Steigung den gesuchten Absorptionskoeffizienten (7564 L/(mol·cm)) ergab (**Abbildung 42**).

Anschließend wurden drei Proben von etwa 10 mg beladenem Harz mit jeweils 1 mL der 20-prozentigen Piperidinlösung in DMF versetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Die dekantierten Lösungen wurden wiederum bei 301 nm photometrisch vermessen und die entsprechenden Absorptionen in **Gleichung 4**, basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, für die Berechnung der Harzbeladung eingesetzt. Aus den Werten der drei Harzproben wurde ein Mittelwert gebildet.

Gleichung 4: Photometrische Bestimmung der Harzbeladung (A: Absorptionswert; V = Volumen der vermessenen Lösung; ϵ : Absorptionskoeffizient des Fmoc-Piperidin-Abspaltproduktes (Dibenzofulven-Piperidin-Addukt) bei 301 nm; d: Flüssigkeitsschichtdicke der Quarzküvette; m: Masse der Harzprobe).

$$\text{Beladung} = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot m}$$

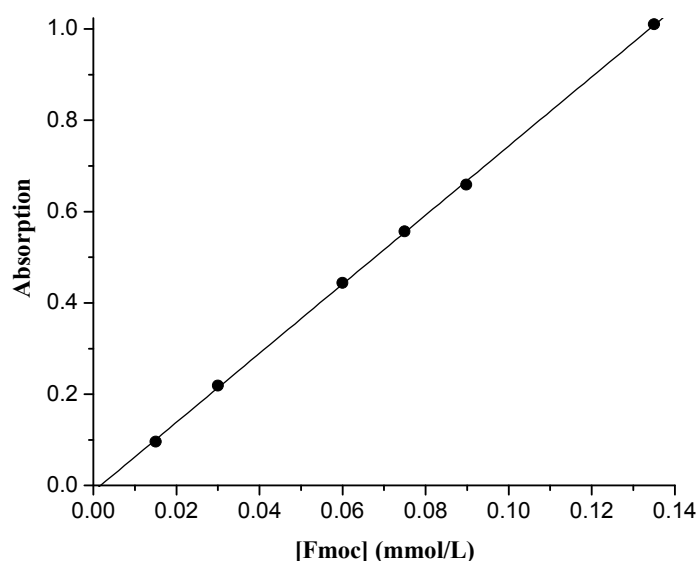


Abbildung 42: Kalibriergerade des Fmoc-Piperidin-Abspaltproduktes (Dibenzofulven-Piperidin-Addukt). Dazu wurde eine Fmoc-Gly-OH-Stammlösung 30 min mit 20 % Piperidin in DMF (v/v) behandelt, anschließend mit dem identischen Lösungsmittelgemisch verdünnt und bei 301 nm vermessen ([Fmoc] = Konzentration des Fmoc-Gly-OH = Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes; Steigung = Absorptionskoeffizient des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes bei 301 nm = 7564 L/(mol·cm)).

Gravimetrische Bestimmung

Die gravimetrische Bestimmung der Harzbeladung erfolgte nach **Gleichung 5**. Das kuppelnde Teilchen ist in diesem Falle das Fmoc-geschützte Aminosäurederivat, das abgespaltene Teilchen ist HCl.

Gleichung 5: Gravimetrische Bestimmung der Harzbeladung.

$$\text{Beladung} = \frac{\text{Masse beladenes Harz} - \text{Masse unbeladenes Harz}}{(\text{Molare Masse kuppelndes Teilchen} - \text{Molare Masse abgespaltenes Teilchen}) \times \text{Masse beladenes Harz}}$$

Ergebnisse

Für das Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz wurde durch beide Methoden eine Beladung von etwa 0.6 mmol/g bestimmt, für das Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz ca. 0.7 mmol/g.

5.2.1.4 Vorschrift D: Beladung eines Tritylchlorid-Harzes mit einem Amin

Die Beladung des Tritylchlorid-Harzes (Herstellerangabe für die initiale Beladung: 1.50 mmol/g) erfolgte analog zu Vorschrift B mit dem Unterschied, dass 2 eq des einseitig Fmoc-geschützten

Diamins und ein Zusatz von 4 % DMSO (v/v) zum trockenen DCM eingesetzt wurden (Letzteres ermöglichte die komplette Auflösung des Amins). Da die neue Beladung des Tritylchlorid-Harzes nicht bestimmt wurde, wurde bei den nachfolgenden Syntheseschritten die Ursprungsbeladung berücksichtigt.

5.2.1.5 Vorschrift E: Harzabspaltung unter mild-sauren Bedingungen bei Erhalt säurelabiler Schutzgruppen

Nach beendeter Festphasensynthese wurde das Harz 6×1 min mit DCM gewaschen. Das harzgebundene Peptid wurde anschließend mit einer einprozentigen TFA-Lösung in DCM (v/v, 1 mL pro 0.1 g unbeladenes Harz) für 30 min bei RT geschüttelt. Die Abspaltung mit dem geschützten Rohpeptid wurde aus der Spritze gedrückt und gesammelt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um eine möglichst vollständige Harzabspaltung zu gewährleisten. Die vereinigten sauren Peptidlösungen wurden jedesmal sofort mit DIPEA neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.6 Vorschrift F: Kupplung des P1-Bausteins

Zu dem nach Vorschrift E erhaltenen Rohpeptid mit freiem C Terminus (1.0 eq bezogen auf die initiale Harzbeladung) – oder zu einer anderen beliebigen Carboxylkomponente – wurde der P1-Baustein (Aminokomponente, 1.5 eq) zugegeben. Beide Edukte wurden gemeinsam in DMF (ca. 2 mL pro 0.1 g Ursprungsharz) gelöst und im Eisbad auf 0 °C vorgekühlt. Nach Zugabe des Kupplungsreagenzes PyBOP (1.65 eq) und des Additivs 6-Cl-HOBt (4.5 eq) wurde der pH-Wert durch Zugabe von DIPEA (ca. 2 eq bzw. 3 eq, wenn das Amin protoniert als Kation vorlag) auf 8-9 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde weitere 15 min im Eisbad und anschließend 4 h bei RT gerührt. Der pH-Wert wurde immer wieder kontrolliert und ggf. durch Zugabe kleiner Mengen DIPEA auf 8-9 korrigiert. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.7 Vorschrift G: Gleichzeitige Harz- und Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen

Nach beendeter Festphasensynthese wurde das Harz 6×1 min mit DCM gewaschen, die Spüllösung wurde möglichst vollständig abgesaugt und das mit Peptid beladene Harz wurde anschließend mit einer stark sauren Abspatlösung (TFA/TIS/H₂O, 95/2.5/2.5, v/v/v, 1 mL pro 0.1 g unbeladenes Harz) für 3 h bei RT geschüttelt. Die das abgespaltene entschützte Peptid enthaltende Lösung wurde in einen ca. 10-fachen Überschuss an kaltem DEE eingetropft. Das Präzipitat wurde durch

Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit kaltem DEE gewaschen und zum Schluss *in vacuo* getrocknet. Das so erhaltene Peptid wurde auf Vollständigkeit der Schutzgruppenabspaltung mittels HPLC überprüft. Bei unvollständiger Abspaltung wurde der Vorgang mit dem getrockneten Peptid wiederholt.

Auch geschützte Peptide, die nach Vorschrift E erhalten und zunächst weiteren Modifizierungen in Lösung unterzogen wurden, wurden anschließend nach der gleichen Methode entschützt.

5.2.1.8 Vorschrift H: Umwandlung eines Amins in ein Guanidin am Harz

Das harzgebundene Peptid mit freier Aminogruppe (1.0 eq bezogen auf die initiale Harzbeladung) wurde mit einer Lösung aus *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (Bernatowicz et al., 1993) (3.0 eq) und DIPEA (4.0 eq) in DMF (1 mL pro 0.1 g unbeladenes Harz) versetzt und über Nacht bei RT geschüttelt. Das Harz wurde anschließend 6 × 1 min mit DMF gewaschen.

5.2.1.9 Vorschrift I: Umwandlung eines Amins in ein Guanidin in Lösung

Das nach Vorschrift E erhaltene Rohpeptid mit freier Aminogruppe (1.0 eq bezogen auf die initiale Harzbeladung) wurde in DMF gelöst (ca. 2 mL pro 0.1 g Ursprungsharz) und kontinuierlich mit kleinen Portionen 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin × HCl (Bernatowicz et al., 1992) (insgesamt 15.0 eq) oder *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (Bernatowicz et al., 1993) (insgesamt 8.0 eq) bei RT versetzt. Der pH-Wert wurde am Anfang durch Zugabe von DIPEA auf 9-10 eingestellt und während der Reaktion immer wieder korrigiert. Der Reaktionsverlauf wurde durch mehrmalige HPLC-Kontrollen überwacht. Nach 72 h wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA abgebrochen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.10 Vorschrift J: Einführung der Boc-Schutzgruppe

Die zu schützende Verbindung (1.0 eq) wurde in einer ca. 1/1-Mischung (v/v) aus Dioxan und Natronlauge (2 mol/L NaOH in H₂O) gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (Moroder et al., 1976) (1.1 eq) in Dioxan hergestellt, die tropfenweise innerhalb von 30 min zum Edukt zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde durch gelegentliche Zugabe von Natronlauge konstant auf 8-9 gehalten. Nach erfolgter Di-*tert*-butyldicarbonat-Zugabe wurde der Ansatz eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend noch 4 h bei RT gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC und/oder HPLC kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit einer wässrigen 5-prozentigen KHSO₄-Lösung angesäuert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in einer Mischung aus Ethylacetat und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde jeweils dreimal

mit der sauren KHSO_4 -Lösung und einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.11 Vorschrift K: Einführung der Fmoc-Schutzgruppe

Variante K1 für hydrophilere Verbindungen

Die zu schützende Verbindung (1.0 eq) wurde in einer Mischung aus H_2O und wenig MeCN gelöst und die Mischung im Eisbad auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (0.9 eq) in MeCN hergestellt, die tropfenweise innerhalb von 30 min zum Edukt zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde durch mehrmalige Zugabe kleiner Mengen DIPEA auf 8-9 konstant gehalten. Nach erfolgter Fmoc-OSu-Zugabe wurde der Ansatz eine weitere Stunde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ und anschließend noch 2 h bei RT gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC und/oder HPLC kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit einer wässrigen 5-prozentigen KHSO_4 -Lösung angesäuert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in einer Mischung aus Ethylacetat und 5 % KHSO_4 -Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde jeweils dreimal mit der sauren KHSO_4 -Lösung und einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Variante K2 für hydrophobere Verbindungen

Die zu schützende Verbindung (1.0 eq) wurde in DCM gelöst und die Mischung im Eisbad auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (0.9 eq) in DCM hergestellt, die tropfenweise innerhalb von 30 min zum Edukt zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde durch gelegentliche Zugabe kleiner Portionen DIPEA auf 8-9 konstant gehalten. Nach erfolgter Fmoc-OSu-Zugabe wurde der Ansatz eine weitere Stunde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ und anschließend noch 2 h bei RT gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC und/oder HPLC kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in einer Mischung aus Ethylacetat und gesättigter NaCl -Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit der gesättigten NaCl -Lösung gewaschen. Die gesammelte wässrige Phase wurde mit Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.12 Vorschrift L: Einführung der Cbz-Schutzgruppe

Die zu schützende Verbindung (1.0 eq) wurde in einer Mischung aus MeCN und H_2O (70/30, v/v) im Eisbad auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus Cbz-OSu (0.9 eq) in MeCN hergestellt, die tropfenweise innerhalb von 30 min zum Edukt zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde durch mehrmalige Zugabe kleiner Mengen DIPEA auf 8-9 konstant gehalten. Nach erfolgter

Cbz-OSu-Zugabe wurde der Ansatz eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend noch 2 h bei RT gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC und/oder HPLC kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit einer wässrigen 5-prozentigen KHSO₄-Lösung angesäuert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in einer Mischung aus Ethylacetat und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde jeweils dreimal mit der sauren KHSO₄-Lösung und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.13 Vorschrift M: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in Lösung

Variante M1

Die Boc-geschützte Verbindung wurde mit einer stark sauren Abspalllösung (TFA/TIS/H₂O, 95/2.5/2.5, v/v/v, 1 mL pro 0.1 mmol Edukt) für 1.5 h bei RT behandelt. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mittels HPLC nachgewiesen. Der Reaktionsansatz wurde mit H₂O verdünnt, direkt mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Variante M2

Die Boc-geschützte Verbindung wurde mit 1 mol/L HCl in Eisessig (5 mL pro 1 mmol Edukt) für 2 h bei RT behandelt. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mittels HPLC nachgewiesen. Die Suspension wurde mit einem etwa 3-fachen Überschuss an kaltem DEE versetzt und zentrifugiert. Der Rückstand wurde zweimal mit kaltem DEE gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

5.2.1.14 Vorschrift N: Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe in Lösung

Die Cbz-geschützte Verbindung wurde mit 32 % HBr in Eisessig (1 mL pro 0.1 mmol Edukt) für 1 h bei RT behandelt. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mittels HPLC nachgewiesen. Die Suspension wurde mit einem Überschuss an kaltem DEE versetzt und das ausgefallene Rohprodukt zentrifugiert. Der Rückstand wurde zweimal mit kaltem DEE gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

5.2.1.15 Vorschrift O: Abspaltung einer Fmoc-Schutzgruppe in Lösung

Die Fmoc-geschützte Verbindung wurde mit einer 10-prozentigen Diethylamin-Lösung in DMF (1 mL pro 0.1 mmol Edukt) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Abspaltung (HPLC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.1.16 Vorschrift P: Abspaltung der Dde-Schutzgruppe am Harz

Das harzgebundene Lys(Dde)-enthaltende Peptid wurde 3×3 min mit einer frisch hergestellten 3-prozentigen Hydrazin-Lösung in DMF (v/v, 1.5 mL pro 0.1 g Ursprungsharz) bei RT behandelt. Anschließend wurde das Harz 9×1 min mit DMF gewaschen.

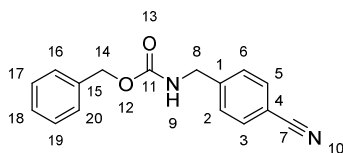
5.2.1.17 Vorschrift Q: Überführung eines aromatischen Nitrils in ein Hydroxyamidin

Das aromatische Nitril (1.0 eq) wurde in möglichst wenig trockenem EtOH gelöst und mit Hydroxylamin \times HCl (1.5 eq) sowie DIPEA (1.5 eq) versetzt. Die Suspension wurde für 6 h unter Rückfluss erhitzt, wobei sich das Hydroxylamin \times HCl in der Wärme komplett gelöst hat. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels HPLC kontrolliert, bei Bedarf wurden nochmal äquivalente Mengen an Hydroxylamin \times HCl und DIPEA zugesetzt und der Ansatz weiter erwärmt. Der Reaktionsansatz wurde *in vacuo* eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde in einer Mischung aus 5 % KHSO₄ und Ethylacetat aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat gewaschen und anschließend mit so viel Natronlauge (10 mol/L) versetzt, bis keine weitere Trübung mehr entstand. Die so gebildete weiße Suspension wurde filtriert und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Die abgetrennte wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.2.2 Niedermolekulare Vorstufen

In einigen Fällen wurde zur Bezeichnung der Strukturen auf die exakte IUPAC-Nomenklatur verzichtet und die in der Peptidchemie üblicherweise verwendeten Namen benutzt.

Benzyl-(4-cyanobenzyl)carbammat (78) (Schema 6, S. 44)

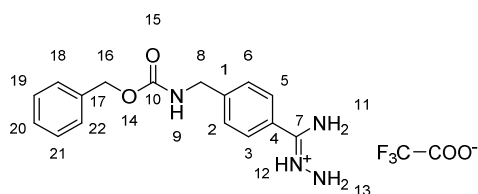


Die Verbindung wurde nach Vorschrift L, ausgehend von 4-(Aminomethyl)benzonitril \times HCl (2.01 g, 11.92 mmol, 1.0 eq) und Cbz-OSu (2.81 g, 11.30 mmol, 0.9 eq), hergestellt.

Ausbeute: 2.79 g, 10.48 mmol, 93 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 54.1; **Reinheit:** 99 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ = 7.92 (t, J = 5.8 Hz, 1H, 9-NH), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.45 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar},

5-CH_{Ar}), 7.39 – 7.28 (m, 5H, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}), 5.05 (s, 2H, 14-CH₂), 4.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 156.4$ (11-CO), 145.6 (1-CH_{Ar}), 137.0 (15-CH_{Ar}), 132.2, 128.3, 127.81, 127.78, 127.7 (insgesamt 9C, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}), 118.8 (7-C≡N), 109.6 (4-CH_{Ar}), 65.5 (14-CH₂), 43.5 (8-CH₂) ppm; MS (ESI⁺): ber. 266.11 [M]; gef. m/z : 284.16 [M+NH₄]⁺.

Benzyl-(4-carbamohydrazonoylbenzyl)carbamat × TFA (**79**) (Schema 6, S. 44) (Reaktionen analog der Vorschriften (DeWolfe and Augustine, 1965; Kim et al., 2006))

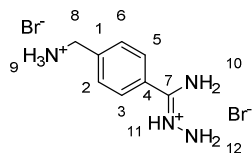


Verbindung **78** (1.00 g, 3.80 mmol, 1.0 eq) wurde in 70 mL einer Mischung aus Dioxan und Isobutanol (50/50, v/v) gelöst und auf 0 °C vorgekühlt. Nach Zugabe von HCl in Dioxan (4 mol/L, 80 mL, 331 mmol, 88 eq) wurde der Reaktionsansatz 1 h im Eisbad gerührt und anschließend zehn Tage im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt. In regelmäßigen Abständen wurden Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt. Nachdem ein maximaler Umsatz von etwa 25 % (Detektionswellenlänge 220 nm; Produkt absorbiert schwächer bei 220 nm und stärker bei 254 nm im Vergleich zum Edukt) erreicht worden war, wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Intermediat (**HPLC (% B)**: 44.8; **MS (ESI⁺)**: ber. 340.18 [M]; gef. m/z : 341.29 [M+H]⁺) ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt. Es wurde in 25 mL einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80/20, v/v) gelöst. Nach Zugabe von Hydrazinhydrat im Überschuss (0.5 mL) wurde der Reaktionsansatz 2 h (bis zum kompletten Umsatz) bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 0.56 g, 1.36 mmol, 37 % über zwei Stufen, gelblich-weißer Feststoff (TFA-Salz); **HPLC (% B)**: 32.7; **Reinheit**: 93%). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 10.92$ (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.81 (s, 1H): 11-NH₂, 12-NH⁺, 13-NH₂ (insgesamt 3H statt 5H im Spektrum sichtbar), 7.94 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, 9-NH), 7.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.38 – 7.30 (m, 5H, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}), 5.05 (s, 2H, 16-CH₂), 4.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 163.2$ (7-C≡N), 156.5 (10-CO), 145.6 (1-CH_{Ar}), 137.1 (17-CH_{Ar}), 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.4, 126.6 (insgesamt 10C, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar},

18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}), 65.6 (16-CH₂), 43.5 (8-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 298.14 [M]; gef. *m/z*: 299.22 [M+H]⁺.

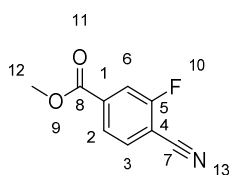
4-Amidrazonbenzylamin × 2 HBr (80) (Schema 6, S. 44)



Die Cbz-Schutzgruppe des Eduktes **79** (0.40 g, 0.97 mmol) wurde nach Vorschrift N mit 32 % HBr in Eisessig abgespalten.

Ausbeute: 0.32 g, 0.97 mmol, quantitativ, weißes Pulver; **HPLC (% B)**: eluiert im Einspritzpeak, Start bei 1 % Laufmittel B; **Reinheit:** 80.0 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)**: δ = 11.00 (bs, 1H), 9.37 (bs, 1H), 8.93 (bs, 1H): 10-NH₂, 11-NH⁺, 12-NH₂ (insgesamt 3H statt 5H im Spektrum sichtbar), 8.37 (s, 3H, 9-NH₃⁺), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 4.17 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆)**: δ = 162.6 (7-C=N), 139.3 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 129.2 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 128.1 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 126.7 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 41.7 (8-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 164.11 [M]; gef. *m/z*: 165.17 [M+H]⁺.

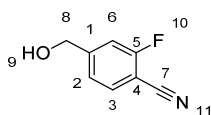
Methyl-4-cyano-3-fluorbenzoat (81) (Schema 7, S. 45) (Huang et al., 2008)



4-Cyano-3-fluorbenzoesäure (1.00 g, 6.06 mmol, 1.0 eq) und Kaliumcarbonat (1.51 g, 10.9 mmol, 1.8 eq) wurden in 20 mL Aceton suspendiert. Zum Ansatz wurde Dimethylsulfat (0.865 mL, 9.09 mmol, 1.5 eq) zugegeben und die Suspension 2 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend gekühlt und filtriert. Das Filtrat wurde *in vacuo* eingeeengt und der ölige Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und einer 5 % wässrigen KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit der 5 % KHSO₄-Lösung und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgedampft; der ölige Rückstand kristallisierte innerhalb von 15 min aus.

Ausbeute: 0.96 g, 5.36 mmol, 90 %, gelbe Kristalle; **HPLC (% B):** 47.6; **Reinheit:** 99 %; **DC (R_f):** 0.82 (Cyclohexan/Ethylacetat/Essigsäure 9/9/2 v/v/v); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ = 8.10 (dd, J = 8.0, 6.5 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 9.7, 1.4 Hz, 1H), 7.92 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 3.91 (s, 1H, 12-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆):** δ = 164.09, 164.06 (zusammen 1C, 8-CO); 163.6, 161.1 (zusammen 1C), 136.34, 136.27 (zusammen 1C), 134.7 (1C), 125.82, 125.79 (zusammen 1C), 116.9, 116.7 (zusammen 1C): insgesamt 5C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}; 113.4 (7-C \equiv N); 104.6, 104.4 (zusammen 1C, 4-CH_{Ar}); 53.1 (12-CH₃) ppm; **MS (ESI+):** ber. 179.04 [M]; gef. m/z : 197.07 [M+NH₄]⁺.

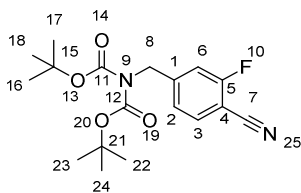
2-Fluor-4-(hydroxymethyl)benzonitril (**82**) (Schema 7, S. 45) (Huang et al., 2008)



Verbindung **81** (0.86 g, 4.80 mmol, 1.0 eq) wurde in 20 mL Methanol gelöst und portionsweise mit NaBH₄ innerhalb von drei Tagen versetzt (insgesamt 1.08 g, 28.8 mmol, 6.0 eq). Dabei wurde der Reaktionsansatz bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Während des ersten Waschschriffs mit gesättigter NaCl-Lösung im Scheidetrichter bildete sich in der wässrigen Phase eine weiße Suspension, diese wurde abgetrennt. Die klare organische Phase wurde dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Zusätzlich wurde die wässrige Suspension mit Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Der ölige Rückstand wurde im Eisbad gekühlt und kristallisierte innerhalb von 30 min aus.

Ausbeute: 0.69 g, 4.57 mmol, 96 %, gelbliche Kristalle; **HPLC (% B):** 30.4; **Reinheit:** 96 %; **DC (R_f):** 0.53 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ = 7.87 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 5.56 (t, J = 5.7 Hz, 1H, 9-OH), 4.60 (d, J = 5.4 Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆):** δ = 163.9, 161.3 (zusammen 1C), 152.7, 152.6 (zusammen 1C), 133.7 (1C), 122.9, 122.8 (zusammen 1C), 113.6, 113.4 (zusammen 1C): insgesamt 5C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}; 114.3 (1C, 7-C \equiv N); 98.0, 97.8 (zusammen 1C, 4-CH_{Ar}); 61.8, 61.7 (zusammen 1C, 8-CH₂) ppm; **MS (ESI+):** ber. 151.04 [M]; gef. m/z : 169.06 [M+NH₄]⁺.

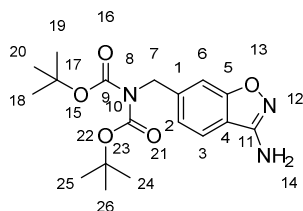
Bis-Boc-4-(Amidomethyl)-2-fluorbenzonitril (83) (Schema 7, S. 45) (Reaktionen analog der Vorschriften (Khazdooz et al., 2016; Kim et al., 2007))



KBr (0.90 g, 7.94 mmol, 2.0 eq) und P_2O_5 (1.58 g, 11.90 mmol, 3.0 eq) wurden in 150 mL Acetonitril suspendiert. Zur Suspension wurde tropfenweise das in Acetonitril gelöste Derivat **82** (0.60 g, 3.97 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei RT gerührt, danach mit Acetonitril verdünnt und zentrifugiert. Der Rückstand wurde abgetrennt und dreimal mit Acetonitril gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter reduziertem Druck eingeeengt und das gelbe ölige Rohprodukt (instabiles Intermediat; **HPLC (% B)**: 53.4; **Reinheit**: 90 %; **DC (R_f)**: 0.83 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v); **MS (ESI+)**: ber. 212.96 [M]; gef. m/z : 214.07 [$M+H$]⁺) direkt im nächsten Reaktionsschritt weiter umgesetzt. Dazu wurde es in 20 mL trockenem THF gelöst und der Ansatz auf 0 °C gekühlt. Es wurde eine Lösung aus Di-*tert*-butyliminodicarboxylat (1.72 g, 7.94 mmol, 2.0 eq) und Natriumhydrid (0.19 g, 7.94 mmol, 2.0 eq) in THF (beide Reagenzien zusammen gelöst) zugegeben und die entstandene Suspension 1 h im Eisbad und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft, der Rückstand in Ethylacetat gelöst und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat reextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* abgedampft und das dabei erhaltene gelbliche Öl kristallisierte langsam aus.

Ausbeute: 1.37 g, 3.90 mmol, 98 % über zwei Stufen, gelbliche Kristalle; **HPLC (% B)**: 70.7; **Reinheit**: 86.3 %; **DC (R_f)**: 0.88 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v); **1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6)**: δ = 7.92 (dd, J = 7.9, 6.9 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 10.4, 1.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H); 2- CH_{Ar} , 3- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} , 4.78 (s, 2H, 8- CH_2), 1.40 (s, 18H, 16- CH_3 , 17- CH_3 , 18- CH_3 , 22- CH_3 , 23- CH_3 , 24- CH_3) ppm; **^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6)**: δ = 150.2 (2C, 11-CO, 12-CO); 163.6, 161.1 (zusammen 1C), 148.0, 147.9 (zusammen 1C), 134.1 (1C), 123.34, 123.31 (zusammen 1C), 114.6, 114.4 (zusammen 1C); insgesamt 5C: 1- CH_{Ar} , 2- CH_{Ar} , 3- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} ; 113.9 (7-C \equiv N); 98.7, 98.5 (zusammen 1C, 4- CH_{Ar}); 80.0 (2C, 15- C_{quart} , 21- C_{quart}); 48.4 (8- CH_2); 27.7 (6C, 16- CH_3 , 17- CH_3 , 18- CH_3 , 22- CH_3 , 23- CH_3 , 24- CH_3) ppm; **^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO- d_6)**: δ = -108.56 (s, 1F, 10-F) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 350.16 [M]; gef. m/z : 373.30 [$M+Na$]⁺.

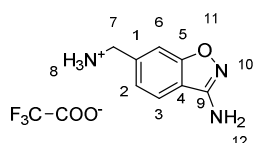
Bis-Boc-6-(Amidomethyl)benzo[d]isoxazol-3-amin (84) (Schema 7, S. 45) (Reaktion analog der Vorschrift (Quan et al., 2005))



Kalium-*tert*-butanolat (0.29 g, 2.58 mmol, 3.0 eq) und Acetohydroxamsäure (0.19 g, 2.58 mmol, 3.0 eq) wurden in 5 mL DMF gelöst. Die entstandene dickflüssige Suspension wurde 40 min bei RT gerührt. Danach wurde das Derivat **83** (0.30 g, 0.86 mmol, 1.0 equiv) als Feststoff zugegeben und die Suspension 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 0.11 g, 0.30 mmol, 35 %, gelblicher Feststoff; **HPLC (% B):** 63.2; **Reinheit:** 98.4 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 7.78 (dd, J = 8.1, 0.5 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.11 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H): 2-*CH*_{Ar}, 3-*CH*_{Ar}, 6-*CH*_{Ar}, 6.37 (s, 2H, 14-NH₂), 4.79 (s, 2H, 7-CH₂), 1.39 (s, 18H, 18-CH₃, 19-CH₃, 20-CH₃, 24-CH₃, 25-CH₃, 26-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 162.1 (11-C=N), 152.1 (2C, 9-CO, 10-CO), 158.5, 141.0, 121.7, 121.0, 116.0, 107.3 (insgesamt 6C, 1-*CH*_{Ar}, 2-*CH*_{Ar}, 3-*CH*_{Ar}, 4-*CH*_{Ar}, 5-*CH*_{Ar}, 6-*CH*_{Ar}), 82.3 (2C, 17-*C*_{quart}, 23-*C*_{quart}), 48.9 (7-CH₂), 27.6 (6C, 18-CH₃, 19-CH₃, 20-CH₃, 24-CH₃, 25-CH₃, 26-CH₃) ppm; **MS (ESI+):** ber. 363.18 [M]; gef. m/z : 364.38 [M+H]⁺.

6-(Aminomethyl)benzo[d]isoxazol-3-amin × TFA (85) (Schema 7, S. 45)

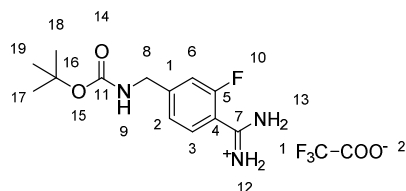


Die zwei Boc-Schutzgruppen des Edukts **84** (0.1 g, 0.23 mmol) wurden nach Vorschrift M1 mit 95 % TFA abgespalten.

Ausbeute: 63.6 mg, 0.23 mmol, quantitativ, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 11.9; **Reinheit:** 98 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 8.33 (s, 3H, 8-NH₃⁺), 7.84 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H): 2-*CH*_{Ar}, 3-*CH*_{Ar}, 6-*CH*_{Ar}, 4.17 (q, J = 5.3 Hz, 2H, 7-CH₂) ppm, die Aminogruppe 12-NH₂ konnte nicht detektiert werden; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 161.9 (9-C=N), 158.5, 136.2, 122.9, 122.0, 116.9, 109.7 (insgesamt

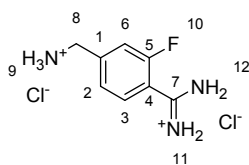
6C, 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 42.3 (7-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 163.07 [M]; gef. *m/z*: 164.08 [M+H]⁺.

***tert*-Butyl-(4-carbamimidoyl-3-fluorbenzyl)carbamat × TFA (86) (Schema 7, S. 45)**



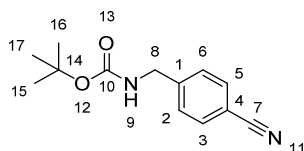
Die Verbindung **83** (1.00 g, 2.85 mmol, 1.0 eq) wurde nach Vorschrift Q in das entsprechende Hydroxyamidin (**HPLC (% B)**: 44.2; **MS (ESI+)**: ber. 383.19 [M]; gef. *m/z*: 384.27 [M+H]⁺) überführt (Hydroxylamin × HCl: 0.30 g, 4.28 mmol, 1.5 eq; DIPEA: 0.75 mL, 4.28 mmol, 1.5 eq). Das rohe Intermediat wurde ohne Reinigung in 20 mL CH₃COOH gelöst, der Ansatz mit Acetanhydrid (0.81 mL, 8.55 mmol, 3.0 eq) versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung des acetylierten und noch Bis-Boc-geschützten Zwischenprodukts (**HPLC (% B)**: 59.1; **MS (ESI+)**: ber. 425.20 [M]; gef. *m/z*: 426.24 [M+H]⁺) wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 90 % Essigsäure verdünnt und mit 50 mg 10 % Pd/C versetzt. Der Reaktionsansatz wurde drei Tage unter H₂-Atmosphäre bei RT hydriert. Das Hauptprodukt dieser Reaktion war das einfach Boc-geschützte Amino-Derivat, die zweite Boc-Schutzgruppe wurde unter den Bedingungen abgespalten. Der Katalysator wurde durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel *in vacuo* eingeeengt. Das einfach Boc-geschützte Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert. Die Verbindung wurde nur als Rohprodukt erhalten (Reinheit ca. 80 %), da bei der präparativen HPLC auch die zweite Boc-Schutzgruppe zum Teil abgespalten wurde.

Ausbeute: 0.23 g, 0.62 mmol, 22 % über drei Stufen, weißer Feststoff; **HPLC (% B)**: 28.3; **Reinheit**: 80 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 9.48 (s, 2H, 12-NH₂ oder 13-NH₂), 9.39 (s, 2H, 12-NH₂ oder 13-NH₂), 7.77 – 7.25 (m, 3H, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 7.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 9-NH), 4.21 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, 8-CH₂), 1.39 (s, 6H, 17-CH₃, 18-CH₃, 19-CH₃: im Spektrum Integral von etwa 6 aufgrund der teilweise Abspaltung auch der zweiten Boc-Schutzgruppe) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 162.1 (7-C=N); 155.8 (11-CO); 161.8, 160.1 (zusammen 1C), 148.5, 130.3, 125.0, 122.9, 114.5: insgesamt 6C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}); 78.2 (16-C_{quart}); 42.8 (8-CH₂); 28.2 (3C 17-CH₃, 18-CH₃, 19-CH₃) ppm; **¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = -73.60 (s, 1F, 1-CF₃ TFA), -113.77 (s, 1F, 10-F) ppm; **MS (ESI+)**: ber. *m/z*: 267.14; gef. *m/z*: 268.18 [M+H]⁺.

4-(Aminomethyl)-2-fluorbenzimidamid \times 2 HCl (87) (Schema 7, S. 45)

Die Boc-Schutzgruppe des Rohproduktes **86** (0.12 g, 0.30 mmol) wurde nach Vorschrift M2 mit 1 mol/L HCl in Eisessig abgespalten.

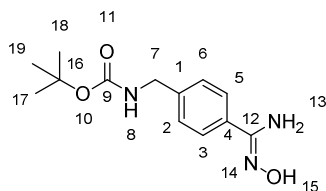
Ausbeute: 0.08 g, 0.30 mmol, quantitativ, weißes Pulver; **HPLC (% B):** eluiert im Einspritzpeak, Start bei 1 % Laufmittel B; **Reinheit:** 99 %; **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):** δ = 9.57 (s, 2H, 11- NH_2 oder 12- NH_2), 9.49 (s, 2H, 11- NH_2 oder 12- NH_2), 8.82 (s, 3H, 9- NH_3^+), 7.75 – 7.54 (m, 3H, 2- CH_{Ar} , 3- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar}), 4.14 (s, 2H, 8- CH_2) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6):** δ = 161.8 (7- $\text{C}=\text{N}$); 159.8, 157.2 (zusammen 1C), 141.6 (1C), 130.5 (1C), 125.2 (1C), 117.3, 117.1 (zusammen 1C), 116.9, 116.7 (zusammen 1C); insgesamt 6C: 1- CH_{Ar} , 2- CH_{Ar} , 3- CH_{Ar} , 4- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} , 41.2 (8- CH_2) ppm; **$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, DMSO-d_6):** δ = -112.97 (s, 1F, 10- F) ppm; **MS (ESI+):** ber. 167.09 [M]; gef. m/z : 168.10 [M+H] $^+$.

***tert*-Butyl-(4-cyanobenzyl)carbamat (88)** (Schweinitz et al., 2006)

Die Verbindung wurde nach Vorschrift J, ausgehend von 4-(Aminomethyl)benzonitril \times HCl (20.0 g, 0.119 mol, 1.0 eq; **HPLC (% B):** 16.3) und Di-*tert*-butyldicarbonat (28.5 g, 0.131 mol, 1.1 eq), hergestellt.

Ausbeute: 26.6 g, 0.114 mol, 96 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 48.4; **Reinheit:** 99 %; **DC (R_f):** 0.7 (DCM/MeOH 9/1 v/v); **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):** δ = 7.78 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 2- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} oder 3- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar}), 7.48 (s, 1H, 9-NH), 7.42 (d, J = 6.7 Hz, 2H, 2- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} oder 3- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar}), 4.20 (d, J = 5.4 Hz, 2H, 8- CH_2), 1.39 (s, 9H, 15- CH_3 , 16- CH_3 , 17- CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6):** δ = 155.8 (10-CO), 146.1 (1- CH_{Ar}), 132.2 (2C, 2- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} oder 3- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar}), 127.7 (2C, 2- CH_{Ar} , 6- CH_{Ar} oder 3- CH_{Ar} , 5- CH_{Ar}), 118.9 (7- $\text{C}\equiv\text{N}$), 109.4 (4- CH_{Ar}), 78.0 (14- C_{quart}), 43.1 (8- CH_2), 28.2 (3C, 15- CH_3 , 16- CH_3 , 17- CH_3) ppm.

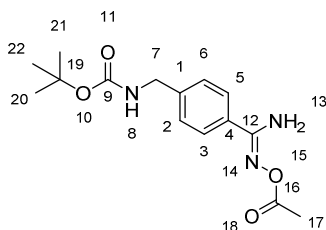
***tert*-Butyl-(4-(*N'*-hydroxycarbamimidoyl)benzyl)carbamate (89) (Schema 8, S. 47)**
(Schweinitz et al., 2006)



Verbindung **88** (20.0 g, 0.086 mol, 1.0 eq) wurde nach Vorschrift Q in das Hydroxyamidin überführt (Hydroxylamin \times HCl: 9.0 g, 0.129 mol, 1.5 eq; DIPEA: 22.5 mL, 0.129 mol, 1.5 eq).

Ausbeute: 17.4 g, 0.066 mol, 76 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.4; **Reinheit:** 99 %; **DC (R_f):** 0.4 (DCM/MeOH/CH₃COOH 19/1/0.5 v/v/v); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 9.55 (s, 1H, 15-OH), 7.61 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.37 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 8-NH), 7.22 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 5.74 (s, 2H, 13-NH₂), 4.13 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 7-CH₂), 1.39 (s, 9H, 17-CH₃, 18-CH₃, 19-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 155.8 (9-CO), 150.7 (12-C=N), 140.9 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 131.8 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 126.6 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 125.3 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 77.8 (16-C_{quart}), 43.1 (7-CH₂), 28.3 (3C, 17-CH₃, 18-CH₃, 19-CH₃) ppm.

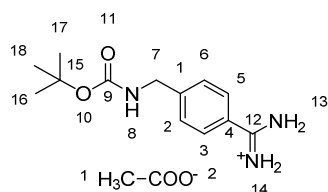
***tert*-Butyl-(4-(*N'*-acetoxycarbamimidoyl)benzyl)carbamate (90)** (Schweinitz et al., 2006)



Verbindung **89** (17.0 g, 0.064 mol, 1.0 eq) wurde in CH₃COOH gelöst und mit Acetanhydrid (18.1 mL, 0.192 mol, 3.0 eq) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei RT gerührt. Nach Vervollständigung der Umsetzung (HPLC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck und mäßiger Wärme abgedampft (Wasserbad 35 °C, um die Zyklisierung zum 1,2,4-Oxadiazol-Derivat zu minimieren). Der ölige Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst. Während des Waschschritts mit gesättigter NaCl-Lösung wurden erste Kristalle in der organischen Phase beobachtet. Um die Kristallisation zu verstärken, wurde die organische Phase etwas eingengt und über Nacht im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt. Das kristallisierte Produkt wurde filtriert, der Rückstand mit H₂O auf der Fritte gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

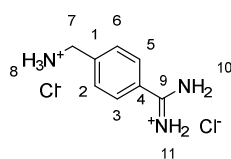
Ausbeute: 19.1 g, 0.062 mol, 97 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 38.1; **Reinheit:** 96 %; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.41 (t, J = 5.9 Hz, 1H, 8-NH), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 6.74 (s, 2H, 13-NH₂), 4.16 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 7-CH₂), 2.13 (s, 3H, 17-CH₃), 1.40 (s, 9H, 20-CH₃, 21-CH₃, 22-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 168.4 (16-CO), 156.3 (9-CO), 155.8 (12-C=N), 142.6 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 130.0 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 126.7 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 126.6 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 77.8 (19-C_{quart}), 43.1 (7-CH₂), 28.2 (3C, 20-CH₃, 21-CH₃, 22-CH₃), 19.8 (17-CH₃) ppm.

***tert*-Butyl-(4-carbamimidoylbenzyl)carbamat × CH₃COOH (91)** (Schema 8, S. 47) (Becker et al., 2010)



Verbindung **90** (19.0 g, 0.062 mol, 1.0 eq) wurde in 90 % CH₃COOH/H₂O (v/v) gelöst. Es wurden 1.9 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd/C, ca. 10 % der Masse des zu hydrierenden Edukts) hinzugefügt und der Ansatz für zwei Tage unter H₂-Atmosphäre bei RT hydriert. Nach Vervollständigung der Reaktion (HPLC-Kontrolle) wurde die Suspension filtriert und der Überstand *in vacuo* eingengt. Der ölige Rückstand wurde anschließend in H₂O gelöst und mit Ethylacetat gewaschen, um den marginalen Rest an Edukt abzutrennen. Dabei bildete sich zwischen den Phasen ein weißer Niederschlag, der durch Filtration abgetrennt wurde. Die wässrige Phase wurde eingengt, der Rückstand mit dem schon vorher ausgefallenen Niederschlag vereinigt und *in vacuo* getrocknet.

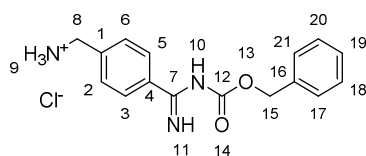
Ausbeute: 17.6 g, 0.057 mol, 92 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.9; **Reinheit:** 97 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 10.23 (bs, 4H, 13-NH₂, 14-NH₂⁺), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.51 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 8-NH), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 4.20 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 7-CH₂), 1.71 (s, 3H, 1-CH₃ Acetat), 1.39 (s, 9H, 16-CH₃, 17-CH₃, 18-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 176.4 (2-CO_{Acetat}), 165.8 (12-C=N), 155.8 (9-CO), 145.8 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 127.8 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 127.7 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 127.1 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 78.0 (15-C_{quart}), 43.1 (7-CH₂), 28.2 (3C, 16-CH₃, 17-CH₃, 18-CH₃), 24.8 (1-CH₃ Acetat) ppm.

4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl (4-Amba) (92) (Schema 8, S. 47) (Becker et al., 2010)

Verbindung **91** (17.0 g, 0.055 mol, 1.0 eq) wurde in einer Mischung aus 40 mL 32 % HCl und 120 mL H₂O gelöst und 1.5 h bei RT gerührt. Die Vollständigkeit der Boc-Abspaltung wurde mittels HPLC kontrolliert. Der Reaktionsansatz wurde unter reduziertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde mithilfe von DEE auf eine Fritte überführt und auf der Fritte mit DEE gewaschen. Zum Schluss wurde der Feststoff *in vacuo* getrocknet.

Ausbeute: 12.2 g, 0.055 mol, quantitativ, weißes Pulver; **HPLC (% B):** eluiert im Einspritzpeak, Start bei 1 % Laufmittel B; **Reinheit:** 99 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 9.60 (s, 2H, 10-NH₂⁺ oder 11-NH₂⁺), 9.43 (s, 2H, 10-NH₂⁺ oder 11-NH₂⁺), 8.87 (s, 3H, 8-NH₃⁺), 7.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 4.13 – 4.09 (m, 2H, 7-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 165.3 (9-C=N), 140.1 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 129.3 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 128.3 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 127.6 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 41.5 (7-CH₂) ppm.

Benzyl-((4-(aminomethyl)phenyl)(imino)methyl)carbamat \times HCl (93) (Schema 8, S. 47)
 (Reaktionen analog der Vorschriften (Hauel et al., 2002))



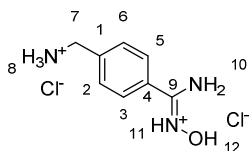
Diese Referenzverbindung wurde von Dr. Kornelia Harges bereitgestellt. Die Synthese erfolgte wie unten beschrieben. Die Zielverbindung (Amidinogruppe Cbz-geschützt, aliphatische Aminogruppe frei) konnte in diesem Falle erhalten werden (siehe ¹H- und H,H-COSY-NMR-Daten im Anhang, S. XXVII).

Verbindung **91** (1.00 g, 3.23 mmol, 1.0 eq) und Kaliumcarbonat (1.43 g, 10.34 mmol, 3.2 eq) wurden in einer Mischung aus 50 mL THF und 10 mL H₂O gelöst und 15 min bei RT gerührt. Zum Ansatz wurde tropfenweise Cbz-Cl (0.42 mL, 2.91 mmol, 0.9 eq) zugegeben und der Reaktionsansatz 2 h bei RT weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Ethylacetat und gesättigter NaCl-Lösung aufgenommen, die organische Phase dreimal mit der NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das

Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die so erhaltene Zwischenstufe (**HPLC (% B)**: 44.2; **MS (ESI+)**: ber. 383.18 [M]; gef. m/z : 384.20 [M+H]⁺) wurde mit HCl gelöst in Ethylacetat (1 mol/L, 10 mL) für 1 h bei RT behandelt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt.

Ausbeute: 0.75 g, 2.33 mmol, 80 % über zwei Stufen, weißes Pulver; **HPLC (% B)**: 23.2; **Reinheit**: 90 %; **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)**: δ = 10.46 (s, 1H, 11-NH), 8.73 (s, 3H, 9-NH₃⁺), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.3 Hz, 2H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 7.51 – 7.35 (m, 6H, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 10-NH), 5.34 (s, 2H, 15-CH₂), 4.13 (q, J = 5.5 Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 283.13 [M]; gef. m/z : 284.02 [M+H]⁺.

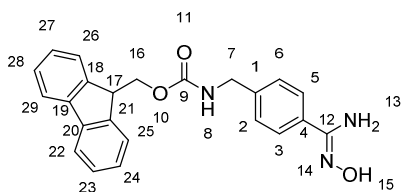
4-Hydroxyamidinobenzylamin × 2 HCl (**94**) (Schema 8, S. 47)



Die Boc-Schutzgruppe des Eduktes **89** (2.0 g, 7.54 mmol, 1.0 eq) wurde nach Vorschrift M2 mittels 1 mol/L HCl in Eisessig abgespalten.

Ausbeute: 1.79 g, 7.54 mmol, quantitativ, weißes Pulver; **HPLC (% B)**: eluiert im Einspritzpeak, Start bei 1 % Laufmittel B; **Reinheit**: 99 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)**: δ = 11.35 (s, 1H, 12-OH), 9.08 (s, 2H, 10-NH₂), 8.78 (s, 3H, 8-NH₃⁺), 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 4.10 (q, J = 5.2 Hz, 2H, 7-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆)**: δ = 158.8 (9-C=N), 139.5 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 129.3 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 128.1 (2C, 2-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar} oder 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 125.3 (1-CH_{Ar} oder 4-CH_{Ar}), 41.6 (7-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 165.09 [M]; gef. m/z : 165.80 [M+H]⁺.

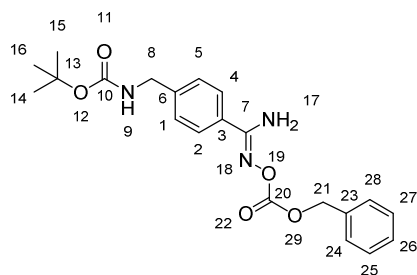
(9H-Fluoren-9-yl)methyl-(4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)benzyl)carbammat (**95**) (Schema 8, S. 47)



Die Verbindung wurde nach Vorschrift K1, ausgehend von der Verbindung **94** (1.0 g, 4.20 mmol, 1.0 eq) und Fmoc-OSu (1.27 g, 3.78 mmol, 0.9 eq), hergestellt.

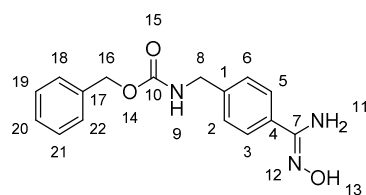
Ausbeute: 0.97 g, 2.50 mmol, 66 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 45.0; **Reinheit:** 98 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ = 11.01 (s, 1H, 15-OH), 8.47 (s, 2H, 13-NH₂), 7.97 (t, J = 6.2 Hz, 1H, 8-NH), 7.90 – 7.32 (m, 12H, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 27-CH_{Ar}, 28-CH_{Ar}, 29-CH_{Ar}), 4.37 (d, J = 6.7 Hz, 2H, 16-CH₂), 4.25 – 4.22 (m, 3H, 7-CH₂, 17-CH) ppm; **¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆):** δ = 158.3 (12-C=N), 156.4 (9-CO), 145.1 (1-CH_{Ar}), 143.8, 140.7, 127.8, 127.2, 125.1, 120.1 (insgesamt 12C, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 27-CH_{Ar}, 28-CH_{Ar}, 29-CH_{Ar}), 127.6, 127.0 (insgesamt 4C, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 124.5 (4-CH_{Ar}), 65.4 (16-CH₂), 46.8 (17-CH), 43.4 (7-CH₂) ppm; **MS (ESI+):** ber. 387.16 [M]; gef. m/z : 388.30 [M+H]⁺.

***tert*-Butyl-(4-(*N'*-(((benzyloxy)carbonyloxy)carbamimidoyl)benzyl)carbamate (96)**
(Schema 8, S. 47)



Die Hydroxyamidin-Gruppe des Edukts **89** (5.0 g, 18.8 mmol, 1.0 eq) wurde nach Vorschrift L mit Cbz geschützt (Cbz-OSu: 4.2 g, 16.9 mmol, 0.9 eq).

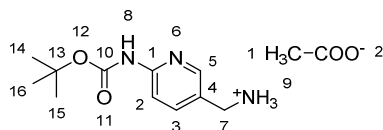
Ausbeute: 6.0 g, 14.9 mmol, 88 %, glitzernde weiße Kristalle; **HPLC (% B):** 58.4; **Reinheit:** 99 %; **DC (R_f):** 0.67 (DCM/MeOH/CH₃COOH 19/1/0.5 v/v/v); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ = 7.63 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.2 Hz, 2H): 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 7.48 – 7.34 (m, 6H, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 27-CH_{Ar}, 28-CH_{Ar}, 9-NH), 6.79 (s, 2H, 17-NH₂), 5.21 (s, 2H, 21-CH₂), 4.15 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 8-CH₂), 1.39 (s, 9H, 14-CH₃, 15-CH₃, 16-CH₃) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆):** δ = 156.6 (10-CO), 155.8 (7-C=N), 153.5 (20-CO), 142.8, 135.6, 129.7, 128.5, 128.41, 128.40, 126.8, 126.7 (insgesamt 12C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 27-CH_{Ar}, 28-CH_{Ar}), 77.9 (13-C_{quart}), 68.9 (21-CH₂), 43.1 (8-CH₂), 28.2 (3C, 14-CH₃, 15-CH₃, 16-CH₃) ppm; **MS (ESI+):** ber. 399.18 [M]; gef. m/z : 400.30 [M+H]⁺.

Benzyl-(4-(*N'*-hydroxycarbamimidoyl)benzyl)carbamate (97) (Schema 8, S. 47)

Ziel der Synthese war die Verbindung **97a** (Schema 8) mit freier aliphatischer Aminogruppe und Cbz-geschützter Hydroxyamidin-Gruppe. Die Zielverbindung konnte jedoch nicht auf diese Weise erhalten werden – stattdessen wurde eine Migration der Cbz-Schutzgruppe von der Hydroxyamidin-Gruppe zur aliphatischen Aminogruppe während der Boc-Schutzgruppenabspaltung beobachtet (siehe NMR-Daten im Anhang, S. XXXII-XXXIII), die Reinheit der letztendlich isolierten Verbindung betrug jedoch nur 80 % (Detektion bei 220 nm mittels HPLC).

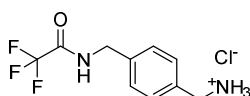
Die Boc-Schutzgruppe des Edukts **96** (2.52 g, 6.31 mmol, 1.0 eq) wurde nach Vorschrift M1 mittels 95 % TFA abgespalten. Der Ansatz wurde jedoch nicht mittels präparativer HPLC gereinigt. Stattdessen wurde direkt nach Beendigung der Reaktion ein Versuch durchgeführt, das entschützte Produkt in kaltem DEE zu fällen. Die Fällung erfolgte nicht vollständig. Daher wurde das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand in gesättigter NaHCO₃-Lösung (und Zusatz von Natronlauge, 1 mol/L, bis zur alkalischen Reaktion) suspendiert. Der Feststoff löste sich in der Suspension zugegebenen Ethylacetat. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die wässrige Phase mit Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, es konnte jedoch nur ein Rohprodukt mit einer Reinheit von 80 % erhalten werden.

Ausbeute: 1.42 g, 4.74 mmol, 75 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 32.5; **Reinheit:** 80 %; **DC (*R_f*):** 0.43 (DCM/MeOH/DIPEA 2/1/0.5 v/v/v); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 9.56 (s, 1H, 13-OH), 7.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 9-NH), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 7.39 – 7.30 (m, 5H, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}), 5.75 (s, 2H, 11-NH₂), 5.05 (s, 2H, 16-CH₂), 4.21 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 156.4 (7-C=N), 150.7 (10-CO), 140.5, 137.2, 132.0, 128.4, 127.8, 127.78, 126.7, 125.4 (insgesamt 12C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}), 65.4 (16-CH₂), 43.6 (8-CH₂) ppm; **MS (ESI+):** ber. 299.13 [M]; gef. *m/z*: 300.21 [M+H]⁺.

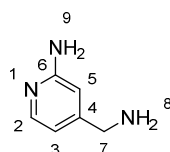
***tert*-Butyl-(5-(aminomethyl)pyridin-2-yl)carbamat \times CH₃COOH (98)**

Die Verbindung wurde von Prof. Dr. Steinmetzer bereitgestellt (Dönnecke et al., 2007).

Weißes Pulver; **HPLC (% B)**: 22.7; **Reinheit**: 99. %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 9.61 (s, 1H, 8-NH), 8.17 (d, J = 1.2 Hz, 1H) und 7.73 – 7.67 (m, 2H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 3.68 (s, 2H, 7-CH₂), 1.87 (s, 3H, 1-CH₃ Acetat), 1.47 (s, 9H, 14-CH₃, 15-CH₃, 16-CH₃) ppm, die Protonen der freien Aminogruppe konnten nicht detektiert werden; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 172.3 (2-CO_{Acetat}), 152.7 (10-CO), 151.0, 146.6, 137.1, 132.6, 111.8 (insgesamt 5C, 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}), 79.4 (13-C_{quart}), 42.2 (7-CH₂), 28.0 (3C, 14-CH₃, 15-CH₃, 16-CH₃), 21.5 (1-CH₃ Acetat) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 223.13 [M]; gef. m/z : 224.20 [M+H]⁺.

***N*-(4-(Aminomethyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid \times HCl (99)**

Die Verbindung wurde von Stefan Hinkes synthetisiert und charakterisiert (Hinkes et al., 2016).

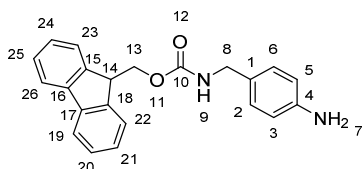
4-(Aminomethyl)pyridin-2-amin (100)

2-Amino-4-cyanopyridin (0.50 g, 4.21 mmol, 1.0 eq) wurde in einer Mischung aus 30 mL Ethanol und 8 mL Triethylamin suspendiert und unter N₂-Atmosphäre mit 50 mg 10 % Pd/C versetzt. Der Reaktionsansatz wurde drei Tage bei RT mit H₂ hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel abgedampft und das Produkt *in vacuo* getrocknet.

Ausbeute: 0.38 g, 3.06 mmol, 73 %, gelbe Kristalle; **HPLC (% B)**: eluiert im Einspritzpeak, Start bei 1 % Laufmittel B; **Reinheit**: 73 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 7.79 – 7.77 (m, 1H) und 6.46 – 6.40 (m, 2H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 5.72 (s, 2H, 7-CH₂), 3.56 (s, 2H, 9-NH₂) ppm, die Protonen der aliphatischen Aminogruppe konnten nicht detektiert werden; **¹³C-**

NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 159.8, 153.3, 147.3, 111.0, 105.7 (insgesamt 5C, 2 CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 44.6 (7-CH₂) ppm; **MS (ESI+):** ber. 123.08 [M]; gef. m/z : 124.07 [M+H]⁺.

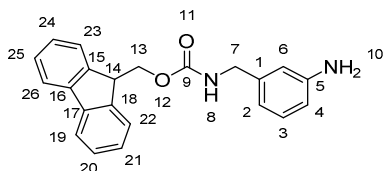
(9H-Fluoren-9-yl)methyl-(4-aminobenzyl)carbammat (101)



Die Verbindung wurde nach Vorschrift K2, ausgehend von 4-(Aminomethyl)anilin (1.01 g, 8.28 mmol, 1.0 eq) und Fmoc-OSu (2.51 g, 7.44 mmol, 0.9 eq), hergestellt.

Ausbeute: 2.57 g, 7.45 mmol, 90 %, gelber Feststoff; **HPLC (% B):** 44.8; **Reinheit:** 96 %; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** δ = 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 7.3 Hz, 2H): 19-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 7.61 (t, J = 5.7 Hz, 1H, 9-NH), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 2H): 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.50 (d, J = 8.2 Hz, 2H): 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 4.91 (s, 2H, 7-NH₂), 4.30 (d, J = 7.0 Hz, 2H, 13-CH₂), 4.21 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 14-CH), 4.00 (d, J = 5.9 Hz, 2H, 8-CH₂) ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6):** δ = 156.2 (10-CO), 143.9, 140.7, 128.0, 127.0, 125.2, 120.0 (insgesamt 12C: 15-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}), 147.4, 127.5, 126.7, 113.6 (insgesamt 6C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 65.2 (13-CH₂), 46.8 (14-CH), 43.5 (8-CH₂) ppm; **MS (ESI+):** ber. 344.15 [M]; gef. m/z : 345.24 [M+H]⁺.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl-(3-aminobenzyl)carbammat (102)

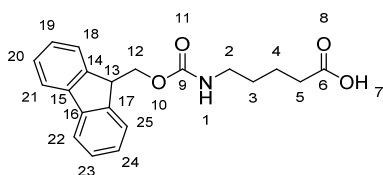


Die Verbindung wurde nach Vorschrift K2, ausgehend von 3-(Aminomethyl)anilin (1.04 g, 8.51 mmol, 1.0 eq) und Fmoc-OSu (2.58 g, 7.66 mmol, 0.9 eq), synthetisiert.

Ausbeute: 2.90 g, 8.42 mmol, 99 %, gelblicher Feststoff; **HPLC (% B):** 45.5; **Reinheit:** 94 %; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** δ = 7.89 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.77 – 7.66 (m, 3H): 19-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 8-NH, 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.3 Hz, 2H): 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 6.96 – 6.34 (m, 4H, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 4.99 (s, 2H,

10-NH₂), 4.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, 13-CH₂), 4.25 – 4.18 (m, 1H, 14-CH), 4.05 – 4.01 (m, 2H, 7-CH₂) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 156.3$ (9-CO), 143.9, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.1 (insgesamt 12C: 15-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}), 148.5, 140.2, 128.7, 114.5, 112.5, 112.4 (insgesamt 6C: 1-CH_{Ar}, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 4-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}), 65.4 (13-CH₂), 46.7 (14-CH), 44.0 (7-CH₂) ppm; MS (ESI+): ber. 344.15 [M]; gef. m/z : 345.33 [M+H]⁺.

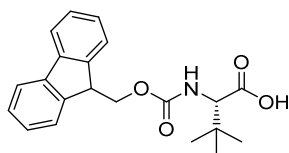
Fmoc-5-Aminovaleriansäure-OH (Fmoc-5-Ava-OH)



Die Verbindung wurde nach Vorschrift K1, ausgehend von 5-Ava-OH (1.0 g, 8.70 mmol, 1.0 eq) und Fmoc-OSu (2.4 g, 6.96 mmol, 0.8 eq), hergestellt.

Ausbeute: 2.1 g, 6.19 mmol, 89 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 56.0; **Reinheit:** 99 %; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 11.97$ (s, 1H, 7-OH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H): 18-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.33 (td, $J = 7.4$, 1.1 Hz, 2H): 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 7.26 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 1-NH), 4.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, 12-CH₂), 4.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, 13-CH), 2.99 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, 2-CH₂), 2.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 5-CH₂), 1.53 – 1.46 (m, 2H, 3-CH₂ oder 4-CH₂), 1.45 – 1.38 (m, 2H, 3-CH₂ oder 4-CH₂) ppm; ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 174.3$ (6-CO), 156.1 (9-CO), 143.9, 140.7, 127.5, 127.0, 125.1, 120.0 (insgesamt 12C: 14-CH_{Ar}, 15-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 21-CH_{Ar}, 22-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}), 65.2 (12-CH₂), 46.8 (13-CH), 33.3, 28.8, 21.7 (insgesamt 4C: 2-CH₂, 3-CH₂, 4-CH₂, 5-CH₂) ppm; MS (ESI-): ber. 339.15 [M]; gef. m/z : 338.24 [M-H]⁻.

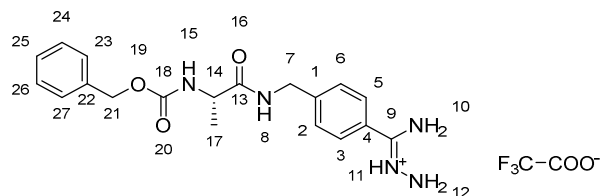
Fmoc-tert-Leucin-OH (Fmoc-Tle-OH) (Hardes, 2014)



Die Verbindung wurde nach Vorschrift K1, ausgehend von H-L-tert-Leucin-OH (6.4 g, 0.049 mol, 1.0 eq) und Fmoc-OSu (14.8 g, 0.044 mol, 0.8 eq), synthetisiert.

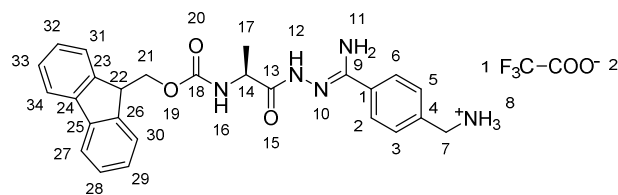
Ausbeute: 15.4 g, 0.043 mol, 98 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 62.8; **Reinheit:** 99 %;

5.2.3 Probesynthesen

Acylierung des Bausteins **80****Cbz-Ala-4-Amidrazonbenzylamid** × TFA (**103**) (Schema 12, S. 56)

An Cbz-Ala-OH (3.0 mg, 14.3 μmol , 1.0 eq) wurde die Verbindung **80** (7.0 mg, 21.5 μmol , 1.5 eq) mithilfe von PyBOP (12.0 mg, 23.6 μmol , 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (11.0 mg, 64.4 μmol , 4.5 eq) und DIPEA (7.5 μL , 42.9 μmol , 3.0 eq) nach Vorschrift F gekuppelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit TFA angesäuert und in kaltem Methyl-*tert*-butylether gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit Methyl-*tert*-butylether gewaschen, *in vacuo* getrocknet, anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt und zum Schluss lyophilisiert.

Ausbeute: 1 mg, 2 μmol , 14 %, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 29.2; **Reinheit:** 96 %; **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):** δ = 10.88 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 8.81 (s, 1H): 10-NH₂, 11-NH⁺, 12-NH₂ (insgesamt 3H statt 5H im Spektrum sichtbar), 8.51 (t, J = 5.7 Hz, 1H, 8-NH), 7.66 – 7.31 (m, 10H, 2-CH_{Ar}, 3-CH_{Ar}, 5-CH_{Ar}, 6-CH_{Ar}, 23-CH_{Ar}, 24-CH_{Ar}, 25-CH_{Ar}, 26-CH_{Ar}, 27-CH_{Ar}, 15-NH), 5.03 (q, J = 12.6 Hz, 2H, 21-CH₂), 4.36 (d, J = 5.3 Hz, 2H, 7-CH₂), 4.11 – 4.04 (m, 1H, 14-CH), 1.24 (d, J = 7.2 Hz, 3H, 17-CH₃) ppm; **MS (ESI⁺):** ber. 369.18 [M]; gef. m/z : 370.34 [M+H]⁺.

Fmoc-Ala-4-Amidrazonobenzylamin × TFA (**104**) (Schema 12, S. 56)

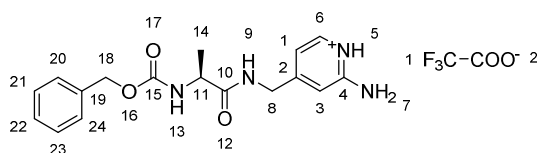
An Fmoc-Ala-OH (0.037 g, 0.117 mmol, 1.0 eq) wurde das Derivat **79** (0.072 g, 0.176 mmol, 1.5 eq) mithilfe von PyBOP (0.100 g, 0.193 mmol, 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (0.090 g, 0.527 mmol, 4.5 eq) und DIPEA (61.1 μL , 0.351 mmol, 3.0 eq) nach Vorschrift F, jedoch in DCM statt in DMF, gekuppelt. Die Cbz-Schutzgruppe des Zwischenprodukts (**HPLC (% B):** 53.3; Retentionszeit fast identisch mit der des Edukts Fmoc-Ala-OH) wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels nach Vorschrift N mit 32 % HBr in Eisessig abgespalten. Das Endprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 10 mg, 17.5 μmol , 15 % über zwei Stufen, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 38.5; **Reinheit:** 96 %; **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):** δ = 10.87 (s, 1H, 12-NH), 8.33 (s, 3H, 8-NH $_3^+$), 7.92 – 7.32 (m, 13H, 2-CH $_{\text{Ar}}$, 3-CH $_{\text{Ar}}$, 5-CH $_{\text{Ar}}$, 6-CH $_{\text{Ar}}$, 27-CH $_{\text{Ar}}$, 28-CH $_{\text{Ar}}$, 29-CH $_{\text{Ar}}$, 30-CH $_{\text{Ar}}$, 31-CH $_{\text{Ar}}$, 32-CH $_{\text{Ar}}$, 33-CH $_{\text{Ar}}$, 34-CH $_{\text{Ar}}$, 16-NH), 4.41 – 4.15 (m, 6H, 7-CH $_2$, 14-CH, 21-CH $_2$, 22-CH), 1.35 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 17-CH $_3$), 1.24 (s, 2H, 11-NH $_2$) ppm; **MS (ESI+):** ber. 457.21 [M]; gef. m/z : 458.25 [M+H] $^+$.

Durch diese Synthesen konnte bewiesen werden, dass die aliphatische Aminogruppe des freien Bausteins **80** – und nicht die Amidrazon-Gruppe – bevorzugt durch eine Carboxylkomponente acyliert wird.

Acylierung des freien Bausteins 100

Cbz-Ala-4-Amidomethyl-2-aminopyridin \times TFA (105) (Schema 12, S. 56)



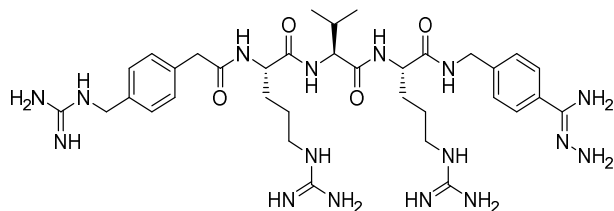
An Cbz-Ala-OH (51.0 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq) wurde das Derivat **100** (42.0 mg, 0.34 mmol, 1.5 eq) mithilfe von PyBOP (195.0 mg, 0.38 mmol, 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (170.0 mg, 1.0 mmol, 4.5 eq) und DIPEA (80.0 μL , 0.46 mmol, 2.0 eq) nach Vorschrift F gekuppelt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 62.6 mg, 0.14 mmol, 62 %, gelblich-weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.6; **Reinheit:** 96 %; **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):** δ = 8.57 (t, J = 5.8 Hz, 1H, 9-NH), 7.96 (s, 2H, 7-NH $_2$), 7.87 (d, J = 6.7 Hz, 1H, 6-CH $_{\text{Ar}}$), 7.51 (d, J = 6.5 Hz, 1H, 13-NH), 7.40 – 7.26 (m, 5H, 20-CH $_{\text{Ar}}$, 21-CH $_{\text{Ar}}$, 22-CH $_{\text{Ar}}$, 23-CH $_{\text{Ar}}$, 24-CH $_{\text{Ar}}$), 6.77 – 6.68 (m, 2H, 1-CH $_{\text{Ar}}$, 3-CH $_{\text{Ar}}$), 5.03 (q, J = 12.6 Hz, 2H, 18-CH $_2$), 4.27 (qd, J = 17.0, 5.8 Hz, 2H, 8-CH $_2$), 4.09 (p, J = 7.2 Hz, 1H, 11-CH), 1.27 (d, J = 7.2 Hz, 3H, 14-CH $_3$) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6):** δ = 173.1 (10-CO), 155.7 (15-CO), 157.3, 154.0, 136.9, 135.9, 128.3, 127.7, 111.0, 109.3 (insgesamt 11C, 1-CH $_{\text{Ar}}$, 2-CH $_{\text{Ar}}$, 3-CH $_{\text{Ar}}$, 4-CH $_{\text{Ar}}$, 6-CH $_{\text{Ar}}$, 19-CH $_{\text{Ar}}$, 20-CH $_{\text{Ar}}$, 21-CH $_{\text{Ar}}$, 22-CH $_{\text{Ar}}$, 23-CH $_{\text{Ar}}$, 24-CH $_{\text{Ar}}$), 65.4 (18-CH $_2$), 50.2 (11-CH), 41.5 (8-CH $_2$), 18.1 (14-CH $_3$) ppm; **MS (ESI+):** ber. 328.15 [M]; gef. m/z : 329.27 [M+H] $^+$.

Durch diese Synthese konnte bewiesen werden, dass die aliphatische Aminogruppe des freien Bausteins **100** – und nicht das aromatische Amin – bevorzugt mit einer Carboxylkomponente reagiert.

Inhibitor 68 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidrazonbenzylamid (alternativer Aufbau der Amidrazon-Gruppe aus einem Amidin, analog der Vorschrift (Neunhoffer and Weischedel, 1971))

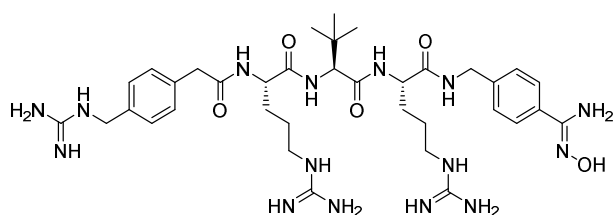
Gewöhnlicher Syntheseweg: siehe **Kapitel 5.2.10.1**



Der Benzamidin-Inhibitor **1** 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba (3.0 mg, 2.49 μ mol, 1.0 eq), bereitgestellt von Dr. Gero Becker (Becker, 2011), wurde in 200 μ L MeOH gelöst und mit Hydrazinhydrat im Überschuss (20 μ L) versetzt. Nach etwa 2 h Rühren bei RT war das Edukt komplett zum entsprechenden Amidrazon (Inhibitor **68**) umgesetzt (HPLC-Kontrolle; Retentionszeit identisch mit der des durch den gewöhnlichen Syntheseweg erhaltenen Inhibitors **68**; der Amidrazon-Inhibitor ist etwas hydrophiler (ca. 1 min bzw. 1 % des Laufmittels B) als das analoge Amidin-Derivat).

Durch diese Reaktion wurde ein alternativer und bequemerer Syntheseweg für den Inhibitor **68** etabliert. Mit dieser Strategie können mehrere Zwischenstufen und zum Teil lange Reaktionszeiten während der Pinner-Reaktion umgangen werden, da sich unter diesen Bedingungen ein Amidin, falls vorhanden, direkt zu dem entsprechenden Amidrazon umsetzen lässt.

Inhibitor 73 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Hydroxyamidinobenzylamid \times 4 TFA – Synthese durch Kupplung des freien P1-Bausteins **94** (siehe auch **Kapitel 3.1.7.5**)



Die Synthese wurde wie für die P1-modifizierten Derivate beschrieben durchgeführt (siehe Synthese des Hemmstoffs **56**, **Kapitel 5.2.10.1**). An das mild abgespaltene Intermediat wurde der freie P1-Baustein **94** (28.6 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) nach Vorschrift F (PyBOP: 68.0 mg, 0.131 mmol, 1.65 eq; 6-Cl-HOBt: 60.4 mg, 0.356 mmol, 4.5 eq; DIPEA: 41.8 μ L, 0.24 mmol, 3.0 eq) gekuppelt. Dabei entstanden viele, z.T. deutlich hydrophobere Nebenprodukte. Das Peptid wurde wie gewohnt gemäß Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen geschützt, danach mittels präparativer HPLC (übliche Bedingungen, 0.1 % TFA in Laufmitteln A und B) gereinigt und zum Schluss lyophilisiert.

Ausbeute: 4.6 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.2; **Reinheit:** 97 % (die Amidin-Verunreinigung war unter diesen Bedingungen nicht sichtbar); **MS (ESI+):** ber. 779.47 [M]; gef. m/z : 780.48 [M+H]⁺.

Anderer Syntheseweg: siehe **Kapitel 5.2.10.4**

5.2.4 AMC-Substrate (Schema 1, S. 33)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz oder 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g für das Arg-Harz bzw. 0.7 mmol/g für das Lys-Harz) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte Festphasensynthese) begonnen. Nach Kupplung der letzten *N*-terminalen Carbonsäure wurden die harzgebundenen Peptide nach Vorschrift E unter mild-sauren Bedingungen abgespalten. Anschließend wurde H-Arg-AMC×2 HCl (jeweils 32.3 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq) nach Vorschrift F gekuppelt (jedoch mithilfe von PyAOP: 41.7 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq, und DIPEA: 41.8 µL, 0.24 mmol, 3.0 eq, ohne 6-Cl-HOBT). Nach erfolgter Reaktion wurden sämtliche Schutzgruppen nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen abgespalten. Während der sauren Schutzgruppenabspaltung verfärbte sich die anfangs gelbe Lösung zu blutrot. Durch das Fällern und Waschen mit DEE konnte die Rotfärbung des Präzipitats nahezu vollständig entfernt werden. Die Rohprodukte der Substrate wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und zum Schluss lyophilisiert. Nach dieser Strategie wurden die folgenden Substrate hergestellt:

Substrat 8 Phac-Arg-Val-Lys-Arg-AMC×3 TFA

Diese Verbindung wurde von Stefan Hinkes in einem Praktikum synthetisiert.

Ausbeute: 99.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 31.2; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 832.47 [M]; gef. m/z 833.20 [M+H]⁺.

Substrat 9 Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-AMC×3 TFA

Ausbeute: 33.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 33.0; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 874.49 [M]; gef. m/z 438.40 [M+2H]²⁺/2.

Substrat 10 Phac-Arg-Tle-Lys-Arg-AMC×3 TFA

Ausbeute: 53.4 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 32.0; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 846.49 [M]; gef. m/z 424.44 [M+2H]²⁺/2.

Substrat **11** Ac-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-AMC×4 TFA

Ausbeute: 56.9 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.0; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 912.54 [M]; gef. m/z 457.40 $[M+2H]^{2+}/2$.

Substrat **12** Ac-Arg-Arg-Tle-Arg-Arg-AMC×4 TFA

Ausbeute: 39.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.2; **Reinheit:** 97 %; **MS (ESI+):** ber. 954.56 [M]; gef. m/z 478.50 $[M+2H]^{2+}/2$.

Substrat **13** Ac-Arg-Arg-Tyr-Lys-Arg-AMC×4 TFA

Ausbeute: 38.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.6; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 976.54 [M]; gef. m/z 489.40 $[M+2H]^{2+}/2$.

5.2.5 Zyklische Inhibitoren und deren Referenzverbindungen

5.2.5.1 Zyklische Inhibitoren (Schema 2, S. 35)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz oder 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g für das Arg-Harz bzw. 0.7 mmol/g für das Lys-Harz) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte Festphasensynthese) begonnen. Teure Fmoc-Aminosäurederivate (Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-2-Nal-OH) wurden dabei nur im 2.5-fachen anstatt im 4-fachen Überschuss gekuppelt. Nach der Kupplung des Fmoc-Phe-OH wurde die automatisierte Synthese beendet. Die finale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell abgespalten. Bernsteinsäureanhydrid (jeweils 31.7 mg, 0.317 mmol, 4.0 eq) und DIPEA (55.1 μ L, 0.317 mmol, 4.0 eq) wurden in ca. 1.5 mL DMF gelöst und zum Harz gegeben. Die Spritze wurde 2 h bei RT geschüttelt. Nach anschließendem Waschen (3×1 min) mit DMF wurde die Dde-Seitenkettenschutzgruppe des Lys(Dde) nach Vorschrift P mit Hydrazin abgespalten. Die Zyklisierung zwischen der Bernsteinsäure und der freien Lys-Seitenkette erfolgte am Harz mithilfe von PyBOP (jeweils 206.1 mg, 0.396 mmol, 5.0 eq), 6-Cl-HOBt (jeweils 67.1 mg, 0.396 mmol, 5.0 eq) und DIPEA (jeweils 137.8 μ L, 0.792 mmol, 10.0 eq) in DMF bei RT über Nacht (Thakkar et al., 2013). Anschließend wurde das Peptid nach Vorschrift E vom Harz unter mild-sauren Bedingungen abgespalten. Danach wurde in Lösung der Baustein 4-Amidinobenzylamin×2 HCl (**92**, jeweils 26.4 mg, 0.119 mmol, 1.5 eq) mittels PyBOP (jeweils 68.0 mg, 0.131 mmol, 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (jeweils 60.4 mg, 0.356 mmol, 4.5 eq) und DIPEA (41.8 μ L, 0.24 mmol, 3.0 eq) nach Vorschrift F an das Peptid gekuppelt. Aufgrund der mehreren vorhandenen Pbf-Schutzgruppen

erfolgte die finale Schutzgruppenabspaltung nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen für 4.5 h bei 40 °C im Wasserbad. Zum Schluss wurden die in DEE gefällten Rohprodukte mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert. Folgende Verbindungen wurden erhalten:

Inhibitor 14 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₃-Lys)-Arg-4-Amba×5 TFA

Ausbeute: 29.2 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 34.8; **Reinheit:** 97 %; **MS (ESI+):** ber. 1327.75 [M]; gef. m/z : 665.10 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 15 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₄-Lys)-Arg-4-Amba×6 TFA

Ausbeute: 22.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 33.2; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1483.85 [M]; gef. m/z : 743.10 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 16 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₅-Lys)-Arg-4-Amba×7 TFA

Ausbeute: 6.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 32.4; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1639.95 [M]; gef. m/z : 821.30 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 17 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₃-Lys)-Lys-4-Amba×5 TFA

Ausbeute: 22.6 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 34.2; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1299.75 [M]; gef. m/z : 651.00 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 18 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₄-Lys)-Lys-4-Amba×6 TFA

Ausbeute: 23.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 32.4; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1455.85 [M]; gef. m/z : 729.20 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 19 c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg)₅-Lys)-Lys-4-Amba×7 TFA

Ausbeute: 13.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 31.5; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1611.95 [M]; gef. m/z : 806.70 [M+2H]²⁺/2.

5.2.5.2 Zyklische Arginin-Derivate (Schema 3, S. 37)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte Festphasensynthese) begonnen. Nach der Kupplung des letzten Fmoc-Arg(Pbf)-OH wurde die finale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, das Harz mehrmals mit

DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Jeweils etwa $\frac{3}{4}$ des Harzes wurden nach Vorschrift E, ein Viertel nach Vorschrift G (siehe **Kapitel 5.2.5.3**) behandelt. Die unter mild-sauren Bedingungen abgespaltenen Peptide wurden in ca. 60 mL DMF gelöst, sodass eine Konzentration von etwa 1.25 mmol/L (Dechantsreiter et al., 1999) resultierte. Der Ansatz wurde mit DIPEA (jeweils 51.7 μ L, 0.297 mmol, 5.0 eq) versetzt, anschließend wurde eine aus PyBOP (jeweils 63.3 mg, 0.119 mmol, 2.0 eq) und 6-Cl-HOBt (20.1 mg, 0.119 mmol, 2.0 eq) hergestellte Lösung in DMF langsam innerhalb von 40 min zum jeweiligen Edukt zugetropft (Thakkar et al., 2013). Der Reaktionsansatz wurde anschließend 48 h bei RT gerührt. Der pH-Wert wurde durch gelegentliche Zugabe kleiner Mengen DIPEA konstant bei 7-8 gehalten. Nach Beendigung der Reaktion (HPLC-Kontrolle) wurde der Ansatz auf ca. 2-3 mL eingeeengt und das Rohprodukt in H₂O gefällt. Das Präzipitat wurde mit H₂O gewaschen, anschließend wurden nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen die Schutzgruppen abgespalten. Aufgrund der vielen vorhandenen Pbf-Schutzgruppen musste die saure Abspaltung jeweils zweimal bei 40 °C für 5 bis 7 h durchgeführt werden. Zum Schluss wurden die Rohprodukte mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert. Es wurden folgende Verbindungen erhalten:

Verbindung **20** c(Arg)₆ × 6 TFA

Ausbeute: 11.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 15.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 936.61 [M]; gef. *m/z*: 937.60 [M+H]⁺.

Verbindung **21** c(Arg)₈ × 8 TFA

Ausbeute: 23.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 17.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1248.81 [M]; gef. *m/z*: 625.50 [M+2H]²⁺/2.

Verbindung **22** c(Arg)₁₀ × 10 TFA

Ausbeute: 12.9 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.2; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1561.01 [M]; gef. *m/z*: 781.70 [M+2H]²⁺/2.

5.2.5.3 Lineare Arginin-Derivate (Schema 3, S. 37)

Die harzgebundenen Zwischenprodukte ($\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Harzmenge, ca. 0.0198 mmol, 1.0 eq, siehe **Kapitel 5.2.5.2**) wurden nach Vorschrift G, jedoch für 5 h, behandelt. Die fertigen Verbindungen wurden daraufhin mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Verbindung 23 H-(Arg)₆-OH × 7 TFA

Ausbeute: 13.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 14.7; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 954.62 [M]; gef. *m/z*: 955.80 [M+H]⁺.

Verbindung 24 H-(Arg)₈-OH × 9 TFA

Ausbeute: 14.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 16.0; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 1266.82 [M]; gef. *m/z*: 634.40 [M+2H]²⁺/2.

Verbindung 25 H-(Arg)₁₀-OH × 11 TFA

Ausbeute: 10.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 18.0; **Reinheit:** 94 %; **MS (ESI+):** ber. 1579.02 [M]; gef. *m/z*: 790.90 [M+2H]²⁺/2.

5.2.6 C-terminal verlängerte Peptidderivate (Tabelle 6, S. 68)

Ausgehend von Fmoc-Rink-Amid-MBHA-Harz (0.12 g, 0.08 mmol, 1 eq; Herstellerangabe für die Beladung: 0.68 mmol/g) wurde die Synthese manuell nach Vorschrift A durchgeführt. Nach Abspaltung der finalen N terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurden die freien Amine nach Vorschrift H mittels *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (jeweils 74.5 mg, 0.24 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (jeweils 55.7 µL, 0.32 mmol, 4.0 eq) in die entsprechenden Bis-Boc-geschützten Guanidine überführt (mit Ausnahme der Verbindungen **32-35**, für die nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe keine weitere Modifikation vorgenommen wurde, und **26-27** ohne N-terminalen Fmoc-Schutz). Zum Schluss wurden alle harzgebundenen Peptide nach Vorschrift G entschützt und freigesetzt, mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 26 Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Pro-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 70.9 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 26.9; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 813.51 [M]; gef. *m/z*: 407.90 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 27 Phac-Arg-Val-Arg-Arg-Pro-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 71.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.0; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 799.49 [M]; gef. *m/z*: 400.86 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 28 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 49.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 23.6; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 829.54 [M]; gef. *m/z*: 830.50 [M+H]⁺.

Inhibitor 29 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 53.2 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.0; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 801.51 [M]; gef. *m/z*: 401.80 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 30 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 50.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.8; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 843.56 [M]; gef. *m/z*: 422.92 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 31 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn-Val-NH₂ × 4 TFA

Ausbeute: 43.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.3; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 844.55 [M]; gef. *m/z*: 422.98 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 32 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 46.4 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 22.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 787.52 [M]; gef. *m/z*: 394.87 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 33 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 44.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.7; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 759.49 [M]; gef. *m/z*: 380.94 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 34 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 51.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.0; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 801.53 [M]; gef. *m/z*: 401.95 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 35 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn-Val-NH₂ × 4 TFA

Ausbeute: 35.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.0; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 802.53 [M]; gef. *m/z*: 402.02 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 36 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Gly-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 30.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.9; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 844.51 [M]; gef. *m/z*: 423.50 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 37 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Lys-Gly-Val-NH₂ × 4 TFA

Ausbeute: 47.6 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.4; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 915.59 [M]; gef. *m/z*: 459.00 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 38 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Gly-Val-NH₂ × 4 TFA

Ausbeute: 49.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.1; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 943.59 [M]; gef. *m/z*: 473.00 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 39 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Ser-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 40.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.8; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 874.52 [M]; gef. *m/z*: 438.50 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 40 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-3-AMe-Phac-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 46.4 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.2; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 877.54 [M]; gef. *m/z*: 440.00 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 41 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-AMe-Phac-Val-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 45.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 26.5; **Reinheit:** 91 %; **MS (ESI+):** ber. 877.54 [M]; gef. *m/z*: 440.00 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 42 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-Ser-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 38.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 23.3; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 916.57 [M]; gef. *m/z*: 917.60 [M+H]⁺.

Inhibitor 43 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-NH₂ × 4 TFA

Ausbeute: 12.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.9; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 787.50 [M]; gef. *m/z*: 263.96 [M+3H]³⁺/3, 1130.79 [M+3TFA+H]⁺.

Inhibitor 45 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-NH₂ × 3 TFA

Ausbeute: 29.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 18.5; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 688.42 [M]; gef. m/z 230.62 [M+3H]³⁺/3, 803.46 [M+TFA+H]⁺.

Analog dazu wurden die Derivate **44** und **46** mit freier C-terminaler Carbonsäure hergestellt, jedoch ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl- oder Fmoc-Gly-2-Chlortrityl-Harz. Die Beladung des Fmoc-Gly-2-Chlortrityl-Harzes wurde nicht bestimmt, es wurde von dem Wert der Beladung des Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harzes ausgegangen.

Inhibitor 44 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-OH × 4 TFA

Ausbeute: 4.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.6; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 788.49 [M]; gef. m/z 263.95 [M+3H]³⁺/3, 1017.77 [M+2TFA+H]⁺.

Inhibitor 46 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-OH × 3 TFA

Ausbeute: 10.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.9; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 689.41 [M]; gef. m/z 345.82 [M+2H]²⁺/2.

5.2.7 Inhibitoren mit Tetra-Leucin-Segment oder zusätzlichem 4-Amba-Rest in der P3-Seitenkette (Schema 4, S. 39)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz oder 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g für das Arg-Harz bzw. 0.7 mmol/g für das Lys-Harz) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte Festphasensynthese) begonnen. Nur die ungewöhnlichen Derivate Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-DLeu-OH und Fmoc-4-AMe-Phac-OH wurden dabei im 2.5-fachen anstatt im 4-fachen Überschuss gekuppelt. Nach der Kupplung des letzten N-terminalen Säurederivats in der Hauptkette wurde die automatisierte Synthese beendet.

Nach Abspaltung der finalen N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe in der Hauptkette der Vorstufen der Verbindungen **47** und **49** wurde das resultierende freie Amin nach Vorschrift H mittels *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (jeweils 74.4 mg, 0.23 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (jeweils 55.6 µL, 0.32 mmol, 4.0 eq) in ein Guanidin überführt. Bei diesen beiden Derivaten wurde danach die P3-Seitenkette weiter modifiziert. Die P3-Lys(Dde)-Schutzgruppe der entsprechenden Intermediate wurde nach Vorschrift P mit Hydrazin abgespalten. Die harzgebundene Zwischenstufe des Inhibitors **47** wurde danach mit einer Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid (31.7 mg, 0.317 mmol, 4.0 eq) und DIPEA (55.1 µL, 0.317 mmol, 4.0 eq) in ca. 1.5 mL DMF für 2 h bei RT

behandelt. Die Festphasenpeptidsynthese des Inhibitors **49** wurde nach Vorschrift A (manuell) fortgesetzt.

Alle Derivate wurden nach Vorschrift E unter mild-sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. An die erhaltenen geschützten Zwischenstufen wurde 4-Amidinobenzylamin $\times 2$ HCl (**92**, jeweils 26.6 mg, 0.120 mmol, 1.5 eq) mithilfe von PyBOP (jeweils 68.7 mg, 0.132 mmol, 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (jeweils 61.1 mg, 0.360 mmol, 4.5 eq) und DIPEA (41.8 μ L, 0.24 mmol, 3.0 eq) nach Vorschrift F gekuppelt (für die Verbindung **47** mit zwei freien Carboxylgruppen wurden die doppelten Mengen an Reagenzien verwendet). Zum Schluss wurden die Verbindungen nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen entschützt, die Rohpeptide mit DEE gefällt und die Produkte mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 47 4-GMe-Phac-Arg-Lys(Suc-4-Amba)-Arg-4-Amba $\times 5$ TFA

Ausbeute: 36.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.1; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 1009.58 [M]; gef. m/z : 505.90 $[M+2H]^{2+}/2$.

Inhibitor 48 Ac-DLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-4-Amba $\times 3$ TFA

Ausbeute: 41.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 40.1; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 1026.71 [M]; gef. m/z : 514.74 $[M+2H]^{2+}/2$.

Inhibitor 49 4-GMe-Phac-Arg-Lys(Gly-Leu-Leu-Leu-DLeu-Ac)-Lys-4-Amba $\times 4$ TFA

Ausbeute: 36.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 38.1; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 1301.84 [M]; gef. m/z : 652.61 $[M+2H]^{2+}/2$.

5.2.8 Derivate mit *N*-terminaler α -Guanidinogruppe (Schema 5, S. 42)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte Festphasensynthese) begonnen. Nach Kupplung des letzten *N*-terminalen Fmoc-Arg(Pbf)-Restes wurden die Zwischenstufen unter Erhalt der finalen Fmoc-Schutzgruppe nach Vorschrift E mild abgespalten. Anschließend wurde an die Peptidintermediate 4-Amidinobenzylamin $\times 2$ HCl (**92**, jeweils 26.6 mg, 0.120 mmol, 1.5 eq) mittels PyBOP (jeweils 68.7 mg, 0.132 mmol, 1.65 eq), 6-Cl-HOBt (jeweils 61.1 mg, 0.360 mmol, 4.5 eq) und DIPEA (41.8 μ L, 0.24 mmol, 3.0 eq) nach Vorschrift F gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde nach Vorschrift O in Lösung abgespalten. Anschließend wurde die freie α -Aminogruppe des Arginins nach Vorschrift I mittels 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin \times HCl (insgesamt jeweils 175.9 mg,

15.0 eq) und DIPEA (pH 9) in ein Guanidin überführt. Alle Derivate wurden zum Schluss nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen vollständig entschützt, mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 50 G-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 6 TFA

Ausbeute: 17.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 18.0; **Reinheit:** 93 %; **MS (ESI+):** ber. 914.59 [M]; gef. m/z : 458.38 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 51 G-Arg-Ala-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 5 TFA

Ausbeute: 16.2 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 17.8; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 829.53 [M]; gef. m/z : 415.87 [M+2H]²⁺/2.

5.2.9 C-terminal verkürzte Peptidderivate (Tabelle 9, S. 74)

Ausgehend von Fmoc-Rink-Amid-MBHA-Harz (0.12 g, 0.08 mmol, 1 eq; Herstellerangabe für die Beladung: 0.68 mmol/g) wurde die Synthese der Carbonsäureamid-Derivate manuell nach Vorschrift A durchgeführt. Nach Abspaltung der finalen *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurden die freien Amine nach Vorschrift H durch Umsezung mit *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (jeweils 74.5 mg, 0.24 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (jeweils 55.7 μ L, 0.32 mmol, 4.0 eq) in die entsprechenden Bis-Boc-geschützten Guanidine überführt. Zum Schluss wurden die harzgebundenen Peptide nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen entschützt und freigesetzt, mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 52 4-GMe-Phac-Arg-NH₂ \times 2 TFA

Ausbeute: 41.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 14.1; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 362.22 [M]; gef. m/z : 182.26 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 53 4-GMe-Phac-Arg-Tle-NH₂ \times 2 TFA

Ausbeute: 33.6 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.2; **Reinheit:** 97 %; **MS (ESI+):** ber. 475.30 [M]; gef. m/z : 238.84 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 54 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH₂ \times 3 TFA

Ausbeute: 56.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.0; **Reinheit:** 95 %; **MS (ESI+):** ber. 631.40 [M]; gef. m/z : 632.50 [M+H]⁺.

Analog dazu wurde das Derivat **55** mit freier C-terminaler Carbonsäure hergestellt, jedoch ausgehend von 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz.

Inhibitor 55 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-OH \times 3 TFA

Ausbeute: 10.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.9; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 632.39 [M]; gef. m/z : 632.99 [M+H]⁺.

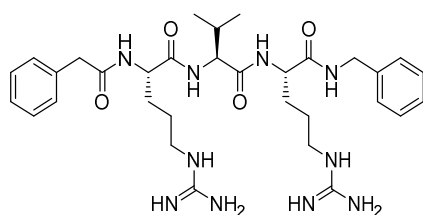
5.2.10 Modifizierung der P1-Position

5.2.10.1 Synthese der Inhibitoren **56**, **61-66**, **68**, **70-72**, **74** und **76** (Schema 9, S. 48)

Ausgehend von jeweils 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g) wurde die Synthese nach Vorschrift A (automatisierte oder manuelle Festphasensynthese) begonnen. Nach Kupplung des letzten Carbonsäurederivates wurden die harzgebundenen Peptide entweder direkt nach Vorschrift E unter mild-sauren Bedingungen vom Harz abgespalten (Intermediate der Inhibitoren **56**, **61-63** und **70**) oder nach Abspaltung des N-terminalen Fmoc-Schutzes zunächst nach Vorschrift H mit *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (jeweils 74.4 mg, 0.23 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (jeweils 55.6 μ L, 0.32 mmol, 4.0 eq) in Guanidine überführt und erst danach nach Vorschrift E vom Harz freigesetzt (Intermediate der Inhibitoren **64-66**, **68**, **71-72**, **74** und **76**). Nach Kupplung des jeweiligen P1-Bausteins nach Vorschrift F (PyBOP: 68.0 mg, 0.13 mmol, 1.65 eq; 6-Cl-HOBt: 60.4 mg, 0.36 mmol, 4.5 eq; DIPEA: 41.8 μ L, 0.24 mmol, 3.0 eq; P1-Bausteine: siehe bei den entsprechenden Inhibitoren) wurden die Derivate nach Vorschrift G vollständig unter stark sauren Bedingungen entschützt. Daraufhin wurden die Intermediate der Inhibitoren **64** und **71** noch von dem Tfa-Schutz befreit, dazu wurde das jeweilige Tfa-geschützte Intermediat in einer Mischung aus 2 mL Dioxan und 1 mL H₂O gelöst und mit 0.5 mL Natronlauge (1 mol/L) versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT (vollständiger Umsatz, HPLC-Kontrolle) wurde der jeweilige Ansatz mit TFA angesäuert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Zum Schluss wurden alle Inhibitoren mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

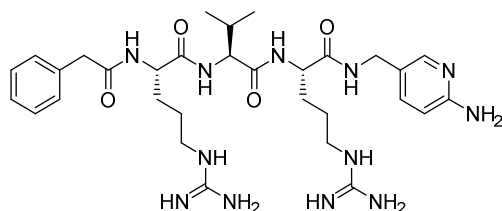
Inhibitor 56 Phac-Arg-Val-Arg-Benzylamid \times 2 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins Benzylamin (13.0 μ L, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 26.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 34.0; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 636.39 [M]; gef. m/z : 637.80 [M+H]⁺.

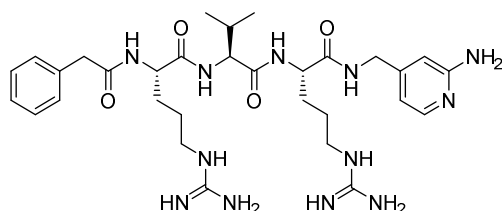
Inhibitor 61 Phac-Arg-Val-Arg-5-Amidomethyl-2-aminopyridin \times 3 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **98** (34.0 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G. Da die Aminokomponente als Acetat-Salz vorliegt, wurde eine Voraktivierung der Carboxylkomponente durchgeführt, um eine Acetylierung des P1-Bausteins **98** zu verhindern. Dazu wurde das unter mild-sauren Bedingungen abgespaltene seitenkettengeschützte P5-P2-Segment zusammen mit PyBOP, 6-Cl-HOBt und DIPEA (pH 8-9) in DMF gelöst. Diese Mischung wurde 15 min im Eisbad gerührt, bevor das Derivat **98** zugegeben wurde. Die Boc-Schutzgruppe des P1-Bausteins wurde zum Schluss zusammen mit den Pbf-Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten.

Ausbeute: 32.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.1; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 652.39 [M]; gef. m/z : 327.44 [M+2H]²⁺/2.

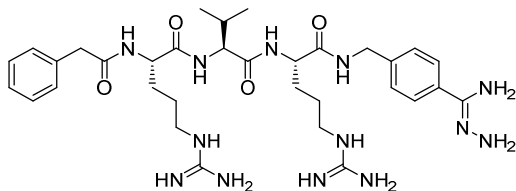
Inhibitor 62 Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidomethyl-2-aminopyridin \times 3 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **100** (14.8 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 56.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 26.5; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 652.39 [M]; gef. m/z : 327.43 [M+2H]²⁺/2.

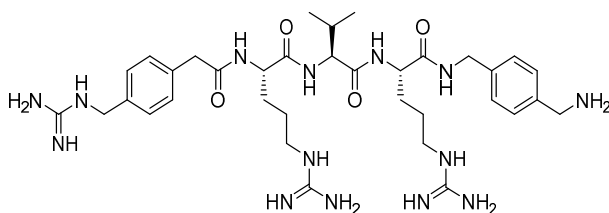
Inhibitor 63 Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidrazonbenzylamid × 3 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **80** (39.1 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 20.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.1; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 693.42 [M]; gef. m/z : 347.97 [M+2H]²⁺/2.

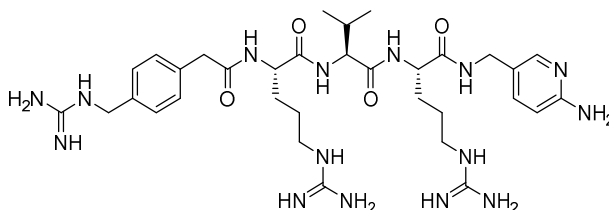
Inhibitor 64 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-*p*-Diaminoxylen × 4 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **99** (32.2 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F, Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G und anschließende Tfa-Schutzgruppenabspaltung mit Natronlauge in Dioxan/H₂O.

Ausbeute: 16.4 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.3; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 736.46 [M]; gef. m/z : 737.50 [M+H]⁺.

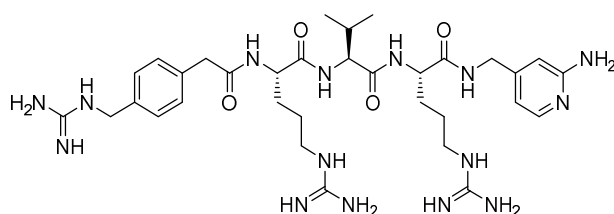
Inhibitor 65 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-5-Amidomethyl-2-aminopyridin × 4 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **98** (34.0 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G. Da die Aminokomponente als Acetat-Salz vorliegt, wurde eine Voraktivierung der Carboxylkomponente durchgeführt, um eine Acetylierung des P1-Bausteins **98** zu verhindern. Dazu wurde das unter mild-sauren Bedingungen abgespaltene seitenkettengeschützte P5-P2-Segment zusammen mit PyBOP, 6-Cl-HOBt und DIPEA (pH 8-9) in DMF gelöst. Diese Mischung wurde 15 min im Eisbad gerührt, bevor das Derivat **98** zugegeben wurde. Die Boc-Schutzgruppe des P1-Bausteins wurde zum Schluss zusammen mit den Pbf-Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten.

Ausbeute: 30.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 18.6; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 723.44 [M]; gef. m/z : 362.81 $[M+2H]^{2+}/2$.

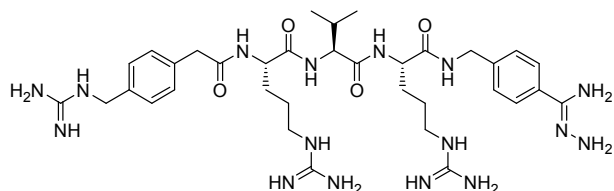
Inhibitor 66 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidomethyl-2-aminopyridin $\times 4$ TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **100** (14.8 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 57.2 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 18.1; **Reinheit:** 98 %; **MS (ESI+):** ber. 723.44 [M]; gef. m/z : 362.93 $[M+2H]^{2+}/2$.

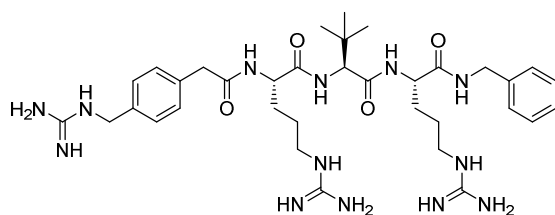
Inhibitor 68 4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amidrazonbenzylamid $\times 4$ TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **80** (39.1 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

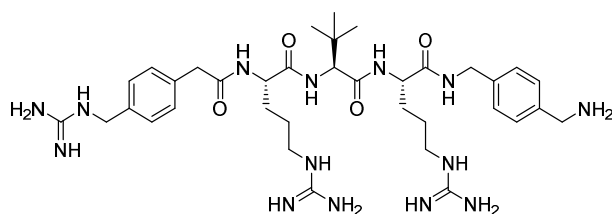
Ausbeute: 10.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.5; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 764.47 [M]; gef. m/z : 383.50 $[M+2H]^{2+}/2$.

Alternativer Syntheseweg: siehe **Kapitel 5.2.3**

Inhibitor 70 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Benzylamid $\times 3$ TFA

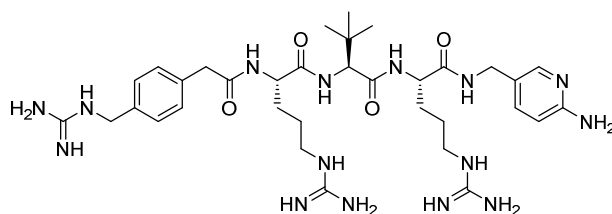
Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins Benzylamin (13.0 μ L, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 27.3 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 28.9; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 721.45 [M]; gef. m/z : 361.92 [M+2H] $^{2+}/2$.

Inhibitor 71 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-*p*-Diaminoxylen $\times 4$ TFA

Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **99** (32.2 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F, Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G und anschließende Tfa-Schutzgruppenabspaltung mit Natronlauge in Dioxan/H₂O.

Ausbeute: 30.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.2; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 750.48 [M]; gef. m/z : 751.50 [M+H] $^{+}$.

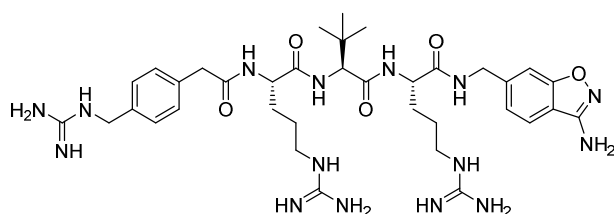
Inhibitor 72 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Amidomethyl-2-aminopyridin $\times 4$ TFA

Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **98** (34.0 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G. Da die Aminokomponente als Acetat-Salz vorliegt, wurde eine Voraktivierung der Carboxylkomponente durchgeführt, um eine Acetylierung des P1-Bausteins **98** zu verhindern. Dazu wurde das unter mild-sauren Bedingungen abgespaltene

seitenkettengeschützte P5-P2-Segment zusammen mit PyBOP, 6-Cl-HOBt und DIPEA (pH 8-9) in DMF gelöst. Diese Mischung wurde 15 min im Eisbad gerührt, bevor das Derivat **98** zugegeben wurde. Die Boc-Schutzgruppe des P1-Bausteins wurde zum Schluss zusammen mit den Pbf-Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten.

Ausbeute: 37.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.2; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 737.46 [M]; gef. m/z : 738.50 [M+H]⁺.

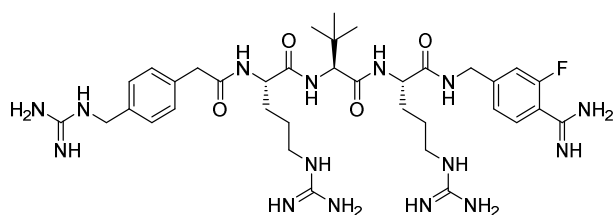
Inhibitor 74 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-6-(Amidomethyl)benzo[*d*]isoxazol-3-amin × 3 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **85** (33.3 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 28.4 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 777.45 [M]; gef. m/z : 390.20 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 76 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-(3-Fluor-4-amidino)benzylamid × 4 TFA



Synthese durch Kupplung des P1-Bausteins **87** (28.8 mg, 0.12 mmol, 1.5 eq) an das geschützte P5-P2-Segment nach Vorschrift F und anschließende vollständige Schutzgruppenabspaltung unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G.

Ausbeute: 54.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.6; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 781.46 [M]; gef. m/z : 392.00 [M+2H]²⁺/2.

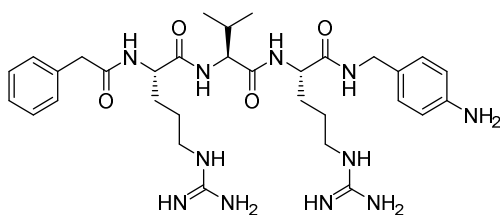
5.2.10.2 Synthese der Inhibitoren 57, 59, 67 und 69 (Schema 10, S. 50)

Tritylchlorid-Harz (jeweils 0.12 g, 0.18 mmol, 1.0 eq) wurde mit dem entsprechenden Amin (Verbindung **101** für Inhibitor **57**, Verbindung **102** für Inhibitoren **59**, **67** und **69**) nach Vorschrift D beladen (Amin: jeweils 0.124 g, 0.36 mmol, 2.0 eq; DIPEA: jeweils 0.125 mL, 0.72 mmol, 4.0 eq). Die anschließende manuelle Festphasenpeptidsynthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift A.

Nach Kupplung der letzten *N*-terminalen Carbonsäure (und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe für die Verbindung **69**) wurden die Inhibitoren **57**, **59** und **69** nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und gleichzeitig entschützt. Vor der sauren Abspaltung wurde die freie Aminogruppe des Intermediats des Inhibitors **67** nach Vorschrift H mit *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (0.168 mg, 0.54 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (0.125 mL, 0.72 mmol, 4.0 eq) in ein Guanidin überführt.

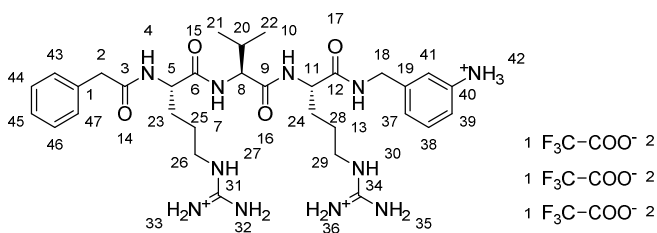
Zum Schluss wurden die Inhibitoren mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 57 Phac-Arg-Val-Arg-4-Aminobenzylamid×3 TFA



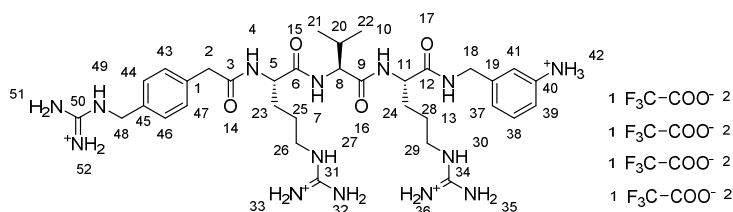
Ausbeute: 59.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.1; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 651.40 [M]; gef. *m/z*: 652.37 [M+H]⁺.

Inhibitor 59 Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid×3 TFA

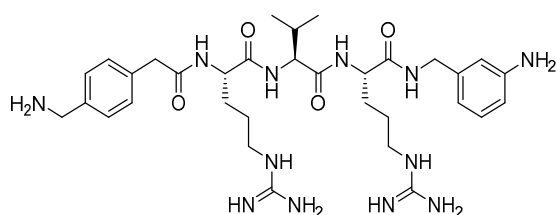


Ausbeute: 46.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 24.9; **Reinheit:** 99 %; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 8.39 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, 13-NH), 8.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4-NH), 8.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 10-NH), 7.76 – 7.66 (m, 3H, 7-NH, 27-NH, 30-NH), 7.32 – 7.09 (m, 14H, 32-NH₂, 33-NH₂, 35-NH₂, 36-NH₂, 38-CH_{Ar}, 43-CH_{Ar}, 44-CH_{Ar}, 45-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}), 6.81 – 6.79 (m, 3H, 37-CH_{Ar}, 39-CH_{Ar}, 41-CH_{Ar}), 4.35 – 4.26 (m, 2H, 5-CH, 11-CH), 4.22 – 4.15 (m, 3H, 8-CH, 18-CH₂), 3.54 – 3.45 (m, 2H, 2-CH₂), 3.11 – 3.03 (m, 4H, 26-CH₂, 29-CH₂), 1.97 (dq, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H, 8-CH), 1.74 – 1.63 (m, 2H, 23-CH, 24-CH), 1.61 – 1.34 (m, 6H, 23-CH,

24-CH, 25-CH₂, 28-CH₂), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 21-CH₃ oder 22-CH₃), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 21-CH₃ oder 22-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 171.4, 171.2, 170.6, 170.4$ (4C, 3-CO, 6-CO, 9-CO, 12-CO), 158.7 (q, $J = 33.0$ Hz, 1C, 2-CO_{TFA}), 156.8 (2C, 31-C=N, 34-C=N), 140.4, 136.2, 129.2, 129.0, 128.2, 126.3 (insgesamt 12C, 1-CH_{Ar}, 43-CH_{Ar}, 44-CH_{Ar}, 45-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 37-CH_{Ar}, 38-CH_{Ar}, 39-CH_{Ar}, 40-CH_{Ar}, 41-CH_{Ar}), 118.1, 115.2 (zusammen 1C, 1-CF₃_{TFA}), 57.5 (8-CH), 52.4, 52.3 (2C, 5-CH, 11-CH), 42.0 (2C, 2-CH₂, 18-CH₂), 40.4, 40.3 (2C, 26-CH₂, 29-CH₂), 30.6 (20-CH), 29.2, 28.9 (2C, 23-CH₂, 24-CH₂), 25.13, 25.07 (2C, 25-CH₂, 28-CH₂), 19.1, 17.8 (2C, 21-CH₃, 22-CH₃) ppm; MS (ESI⁺): ber. 651.40 [M]; gef. m/z : 652.40 [M+H]⁺.

Inhibitor 674-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid $\times 4$ TFA

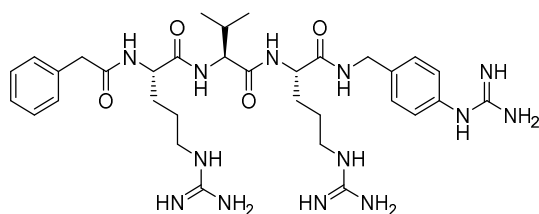
Ausbeute: 28.0 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.2; **Reinheit:** 97 %; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.38$ (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 13-NH), 8.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4-NH), 8.08 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, 49-NH), 8.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 10-NH), 7.84 – 7.58 (m, 3H, 7-NH, 27-NH, 30-NH), 7.53 – 6.99 (m, 17H, 32-NH₂, 33-NH₂, 35-NH₂, 36-NH₂, 51-NH₂, 52-NH₂, 38-CH_{Ar}, 43-CH_{Ar}, 44-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}), 6.67 – 6.73 (m, 3H, 37-CH_{Ar}, 39-CH_{Ar}, 41-CH_{Ar}), 4.44 – 4.24 (m, 4H, 5-CH, 11-CH, 48-CH₂), 4.20 – 4.16 (m, 3H, 8-CH, 18-CH₂), 3.58 – 3.35 (m, 2H, 2-CH₂), 3.12 – 3.06 (m, 4H, 26-CH₂, 29-CH₂), 2.06 – 1.86 (m, 1H, 20-CH), 1.73 – 1.64 (m, 2H, 23-CH, 24-CH), 1.62 – 1.39 (m, 6H, 23-CH, 24-CH, 25-CH₂, 28-CH₂), 0.79 (dd, $J = 13.2, 6.8$ Hz, 6H, 21-CH₃, 22-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 171.4, 171.1, 170.6, 170.2$ (4C, 3-CO, 6-CO, 9-CO, 12-CO), 158.7 (q, $J = 32.9$ Hz, 1C, 2-CO_{TFA}), 156.9, 156.81, 156.80 (3C, 31-C=N, 34-C=N, 50-C=N), 140.2, 135.6, 135.2, 129.2, 129.1, 127.1 (insgesamt 12C, 1-CH_{Ar}, 43-CH_{Ar}, 44-CH_{Ar}, 45-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 37-CH_{Ar}, 38-CH_{Ar}, 39-CH_{Ar}, 40-CH_{Ar}, 41-CH_{Ar}), 118.2, 115.2, 112.2 (zusammen 1C, 1-CF₃_{TFA}), 57.5 (8-CH), 52.3, 52.2 (2C, 5-CH, 11-CH), 43.7 (48-CH₂), 42.1, 41.5 (2C, 2-CH₂, 18-CH₂), 40.4, 40.3 (2C, 26-CH₂, 29-CH₂), 30.6 (20-CH), 29.2, 28.9 (2C, 23-CH₂, 24-CH₂), 25.1, 25.0 (2C, 25-CH₂, 28-CH₂), 19.1, 17.8 (2C, 21-CH₃, 22-CH₃) ppm; MS (ESI⁺): ber. 722.45 [M]; gef. m/z : 362.51 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 69 4-AMe-Phac-Arg-Val-Arg-3-Aminobenzylamid×4 TFA

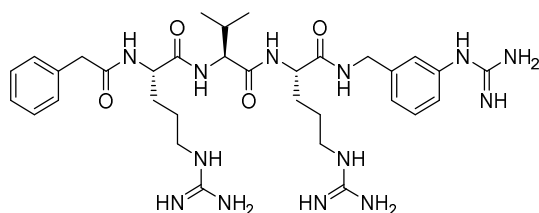
Ausbeute: 10.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 17.7; **Reinheit:** 94 %; **MS (ESI+):** ber. 680.42 [M]; gef. m/z : 341.28 [M+2H]²⁺/2.

5.2.10.3 Synthese der Inhibitoren 58 und 60 (Schema 10, S. 50)

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte analog zur Synthese der Inhibitoren **57** und **59**. Nach Kupplung des *N*-terminalen Phenylelessigsäure-Restes wurden diese Derivate jedoch nach Vorschrift E unter mild-sauren Bedingungen bei Erhalt der Pbf-Schutzgruppen vom Harz abgespalten. Die anschließende Überführung der Aniline in die Guandine erfolgte nach Vorschrift I mittels *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (jeweils 0.447 g, 1.44 mmol, 8.0 eq) und DIPEA (pH 9). Anschließend wurden die Peptide nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen vollständig entschützt, mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 58 Phac-Arg-Val-Arg-4-Guanidinobenzylamid×3 TFA

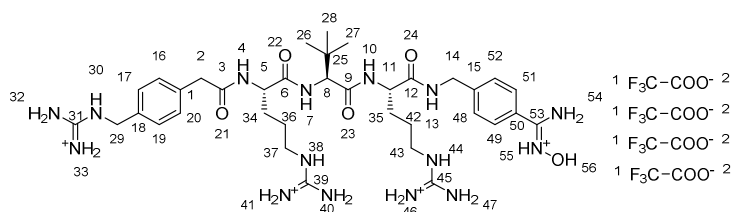
Ausbeute: 85.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 25.5; **Reinheit:** 96 %; **MS (ESI+):** ber. 693.42 [M]; gef. m/z : 347.98 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 60 Phac-Arg-Val-Arg-3-Guanidinobenzylamid×3 TFA

Ausbeute: 58.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 26.3; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+):** ber. 693.42 [M]; gef. m/z : 347.94 [M+2H]²⁺/2.

5.2.10.4 Synthese der Inhibitoren 73, 75 und 77 (Schema 11, S. 51)

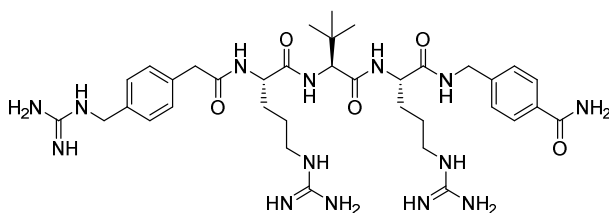
Ausgehend von 0.5 g (0.3 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.6 mmol/g) wurde die Synthese der für alle drei Derivate gemeinsamen Vorstufe nach Vorschrift A (manuelle Festphasensynthese) in einer 5 mL-Spritze mit PTFE-Fritte begonnen. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des Fmoc-4-AMe-Phac-Restes wurde die freie Aminogruppe nach Vorschrift H durch Umsetzung mit *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (0.279 mg, 0.9 mmol, 3.0 eq) und DIPEA (0.209 mL, 1.4 mmol, 4.0 eq) in ein Guanidin überführt. Daraufhin wurde die harzgebundene Vorstufe nach Vorschrift E unter mild-sauren Bedingungen und Erhalt des Seitenkettenschutzes vom Harz abgespalten. An dieses geschützte Peptid wurde 4-(Aminomethyl)benzonitril×HCl (75.9 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq) nach Vorschrift F gekuppelt (PyBOP: 260.2 mg, 0.5 mmol, 1.65 eq; 6-Cl-HOBT: 228.9 mg, 1.35 mmol, 4.5 eq; DIPEA: 0.157 mL, 0.9 mmol, 3.0 eq). Das Zwischenprodukt wurde unter stark sauren Bedingungen nach Vorschrift G von den restlichen Schutzgruppen befreit. Dieser Schritt lieferte den Inhibitor **77**, der mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert wurde. 20 mg dieses Derivats wurden für analytische und enzymkinetische Charakterisierung aufbewahrt. Der Rest wurde nach Vorschrift Q mittels Hydroxylamin×HCl (31.3 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq) und DIPEA (78.2 µL, 0.45 mmol, 1.5 eq) zum Hydroxyamidin (Verbindung **73**) umgesetzt. Diese Reaktion lieferte als Nebenprodukt das Carboxamid-Derivat **75** (etwa 25 % in der HPLC-Kontrolle bei 220 nm). Nach nahezu vollständiger Umsetzung wurde der Reaktionsansatz angesäuert, *in vacuo* eingengt und direkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Beide Inhibitoren wurden isoliert und lyophilisiert.

Inhibitor 73 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba(OH)×4 TFA

Ausbeute: 73.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 21.2; **Reinheit:** 99 % (unter diesen Bedingungen ist die Amidin-Verunreinigung nicht sichtbar (**Kapitel 3.1.7.5**)); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 11.14 (bs, 1H, 56-OH), 8.57 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, 13-NH), 8.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4-NH), 8.16 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 30-NH), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 10-NH), 7.86 – 7.74 (m, 2H, 38-NH, 44-NH); 7.66 – 7.18: m, 21H, davon: 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 48-CH_{Ar}, 52-CH_{Ar} oder 49-CH_{Ar}, 51-CH_{Ar}), 7.55 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, 7-NH), 7.41 – 7.20 (m, 18H, 48-CH_{Ar}, 52-CH_{Ar} oder 49-CH_{Ar}, 51-CH_{Ar}; 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 32-NH₂, 33-NH₂, 40-NH₂,

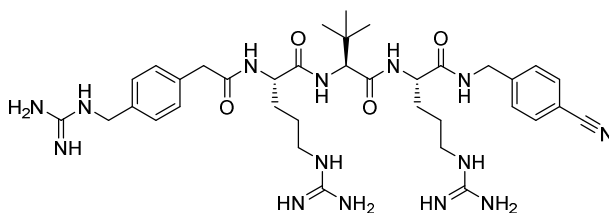
41-NH₂, 46-NH₂, 47-NH₂); 4.47 – 4.19 (m, 7H, 5-CH, 8-CH, 11-CH, 14-CH₂, 29-CH₂), 3.49 (q, $J = 14.2$ Hz, 2H, 2-CH₂), 3.19 – 2.97 (m, 4H, 37-CH₂, 43-CH₂), 1.78 – 1.36 (m, 8H, 34-CH₂, 35-CH₂, 36-CH₂, 42-CH₂), 0.86 (s, 9H, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃) ppm, die Protonen der Gruppe 54-NH₂ konnten nicht als scharfes Signal detektiert werden; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 171.5, 171.2, 170.5, 169.9$ (4C, 3-CO, 6-CO, 9-CO, 12-CO), 159.0 (q, $J = 32.3$ Hz, 1C, 2-CO_{TFA}), 157.0, 156.9 (4C, 31-C=N, 39-C=N, 45-C=N, 53-C=N), 135.6, 135.4, 129.3, 127.5, 127.3, 127.2 (insgesamt 12C, 1-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 15-CH_{Ar}, 48-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar}, 51-CH_{Ar}, 52-CH_{Ar}), 116.9 (q, $J = 297.7$ Hz, 1C, 1-CF₃_{TFA}), 59.5 (8-CH), 52.6, 52.4 (2C, 5-CH, 11-CH), 43.7 (29-CH₂), 41.7, 41.6 (2C, 2-CH₂, 14-CH₂), 40.5, 40.3 (2C, 37-CH₂, 43-CH₂), 34.4 (25-CH), 28.8, 28.7 (2C, 34-CH₂, 35-CH₂), 26.6 (3C, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃), 25.3, 25.2 (2C, 36-CH₂, 42-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 779.47 [M]; gef. m/z : 780.47 [M+H]⁺.

Inhibitor 75 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-(4-Carboxamid)benzylamid×3 TFA



Ausbeute: 17.5 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 22.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+)**: ber. 764.46 [M]; gef. m/z : 765.50 [M+H]⁺.

Inhibitor 77 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Cyanobenzylamid×3 TFA



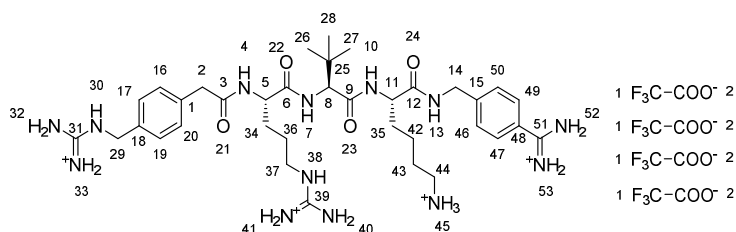
Ausbeute: 174.8 mg (nur 20 mg aufbewahrt), weißes Pulver; **HPLC (% B):** 28.5; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+)**: ber. 746.45 [M]; gef. m/z : 374.30 [M+2H]²⁺/2.

5.2.11 Derivate mit Lysin in P2-Position

5.2.11.1 Synthese des Inhibitors 106

Ausgehend von 0.5 g (0.3 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.7 mmol/g) wurde die Synthese nach Vorschrift A in einer 5 mL-Spritze mit PTFE-Fritte manuell durchgeführt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des terminalen Fmoc-4-AMe-Phac-Restes wurde die freie Aminogruppe nach Vorschrift H in ein Guanidin überführt (durch Umsetzung mit *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin: 0.279 mg, 0.9 mmol, 3.0 eq und DIPEA: 0.209 mL, 1.4 mmol, 4.0 eq). Daraufhin wurde die harzgebundene Vorstufe nach Vorschrift E unter Erhalt aller Schutzgruppen vom Harz abgespalten. An dieses geschützte Peptid wurde 4-Amidinobenzylamin×2 HCl (**92**, 99.9 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq) nach Vorschrift F gekuppelt (PyBOP: 260.2 mg, 0.50 mmol, 1.65 eq; 6-Cl-HOBT: 228.9 mg, 1.35 mmol, 4.5 eq; DIPEA: 0.157 mL, 0.9 mmol, 3.0 eq). Anschließend wurde die Verbindung nach Vorschrift G unter stark sauren Bedingungen von sämtlichen Schutzgruppen befreit, mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Inhibitor 106 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba×4 TFA



Der Inhibitor wurde ursprünglich als TFA-Salz von Dr. Kornelia Hardes synthetisiert und im Rahmen der Arbeit mittels NMR analysiert und in das HCl-Salz (**Kapitel 5.2.12**) überführt.

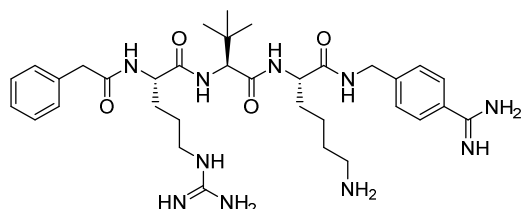
Ausbeute: 154.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.3; **Reinheit:** 99 %; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 9.39 (s, 2H), 9.28 (s, 2H): 52-NH₂, 53-NH₂, 8.58 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 13-NH), 8.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 4-NH), 8.18 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 30-NH), 8.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 10-NH), 7.85 – 7.80 (m, 4H, 38-NH, 45-NH₃), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 46-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar} oder 47-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}), 7.60 – 7.12: m, 15H, davon: 7.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, 7-NH), 7.50 – 7.12 (m, 14H, 46-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar} oder 47-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}; 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 32-NH₂, 33-NH₂, 40-NH₂, 41-NH₂), 4.49 – 4.17 (m, 7H, 5-CH, 8-CH, 11-CH, 14-CH₂, 29-CH₂), 3.49 (q, *J* = 14.2 Hz, 2H, 2-CH₂), 3.11 – 3.04 (m, 2H, 37-CH₂), 2.74 (dd, *J* = 14.5, 5.9 Hz, 2H, 44-CH₂), 1.81 – 1.14 (m, 10H, 34-CH₂, 35-CH₂, 36-CH₂, 42-CH₂, 43-CH₂), 0.86 (s, 9H, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃), ppm; **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 171.7, 171.1, 170.5, 169.9 (4C, 3-CO, 6-CO, 9-CO, 12-CO), 165.5 (51-C=N), 159.0 (q, *J* = 32.1 Hz, 1C, 2-CO_{TFA}), 157.0, 156.9 (2C, 31-C=N, 39-C=N), 145.9, 135.5, 135.4, 129.3, 128.0, 127.3, 127.2, 126.5 (insgesamt 12C, 1-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar},

18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 15-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}, 48-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar}), 117.0 (q, $J = 298.0$ Hz, 1C, 1-CF₃ TFA), 59.6 (8-CH), 52.8, 52.4 (2C, 5-CH, 11-CH), 43.7 (29-CH₂), 41.7, 41.6 (2C, 2-CH₂, 14-CH₂), 40.5 (37-CH₂), 38.7 (44-CH₂), 34.4 (25-CH), 31.1 (43-CH₂), 28.7 (34-CH₂), 26.7 (35-CH₂), 26.6 (3C, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃), 25.2 (36-CH₂), 22.5 (42-CH₂) ppm; **MS (ESI+)**: ber. 735.47 [M]; gef. m/z : 368.74 [M+2H]²⁺/2.

5.2.11.2 Synthese des Inhibitors 107

Diese Verbindung wurde analog zum Inhibitor **106** hergestellt, allerdings ausgehend von 0.12 g (0.08 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz und durch Kupplung des *N*-terminalen Phenyllessigsäure-Restes.

Inhibitor 107 Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba × 3 TFA

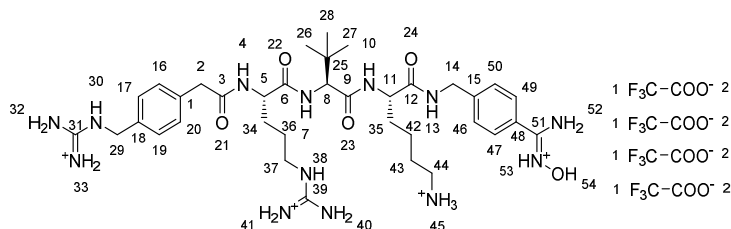


Ausbeute: 77.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.3; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI+)**: ber. 664.42 [M]; gef. m/z : 333.43 [M+2H]²⁺/2.

5.2.11.3 Synthese der Inhibitoren 108 und 109 (Schema 11, S. 51)

Ausgehend von 0.5 g (0.3 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Lys(Boc)-2-Chlortrityl-Harz (hergestellt nach Vorschrift B; Beladung bestimmt nach Vorschrift C: 0.7 mmol/g) wurden diese zwei Hemmstoffe analog zu den P2-Arg-Inhibitoren **73** und **77** hergestellt.

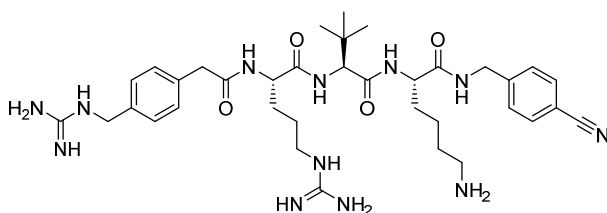
Inhibitor 108 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba(OH) × 4 TFA



Ausbeute: 111.1 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 19.7; **Reinheit:** 99 % (unter diesen Bedingungen ist die Amidin-Verunreinigung nicht sichtbar (**Kapitel 3.1.8**)); **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** $\delta = 11.17$ (bs, 1H, 54-OH), 8.55 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, 13-NH), 8.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H,

4-NH), 8.18 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, 30-NH), 8.08 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 10-NH), 7.84 – 7.80 (m, 4H, 38-NH, 45-NH₃⁺), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 46-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar} oder 47-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}), 7.54 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, 7-NH), 7.52 – 6.85 (m, 14H, 46-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar} oder 47-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}; 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 32-NH₂, 33-NH₂, 40-NH₂, 41-NH₂), 4.44 – 4.16 (m, 7H, 5-CH, 8-CH, 11-CH, 14-CH₂, 29-CH₂), 3.49 (q, $J = 14.2$ Hz, 2H, 2-CH₂), 3.14 – 3.02 (m, 2H, 37-CH₂), 2.74 (dd, $J = 14.6, 6.1$ Hz, 2H, 44-CH₂), 1.73 – 1.20 (m, 10H, 34-CH₂, 35-CH₂, 36-CH₂, 42-CH₂, 43-CH₂), 0.86 (s, 9H, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃) ppm, die Protonen der Gruppe 52-NH₂ konnten nicht als scharfes Signal detektiert werden; ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 171.7, 171.2, 170.5, 169.9$ (4C, 3-CO, 6-CO, 9-CO, 12-CO), 158.8 (q, $J = 32.2$ Hz, 1C, 1-CF₃ TFA), 157.0, 156.9 (3C, 31-C=N, 39-C=N, 51-C=N), 135.6, 135.4, 129.3, 127.5, 127.3, 127.2 (insgesamt 12C, 1-CH_{Ar}, 16-CH_{Ar}, 17-CH_{Ar}, 18-CH_{Ar}, 19-CH_{Ar}, 20-CH_{Ar}, 15-CH_{Ar}, 46-CH_{Ar}, 47-CH_{Ar}, 48-CH_{Ar}, 49-CH_{Ar}, 50-CH_{Ar}), 116.9 (q, $J = 297.8$ Hz, 1C, 2-CO TFA), 59.6 (8-CH), 52.8, 52.4 (2C, 5-CH, 11-CH), 43.7 (29-CH₂), 41.7, 41.6 (2C, 2-CH₂, 14-CH₂), 40.5 (37-CH₂), 38.7 (44-CH₂), 34.4 (25-CH), 31.1 (43-CH₂), 28.7 (34-CH₂), 26.7 (35-CH₂), 26.6 (3C, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃), 25.2 (36-CH₂), 22.5 (42-CH₂) ppm; MS (ESI⁺): ber. 751.46 [M]; gef. m/z : 376.81 [M+2H]²⁺/2.

Inhibitor 109 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Cyanobenzylamid × 3 TFA



Ausbeute: 245.7 mg (nur 20 mg aufbewahrt), weißes Pulver; **HPLC (% B):** 27.8; **Reinheit:** 99 %; **MS (ESI⁺):** ber. 718.44 [M]; gef. m/z : 360.33 [M+2H]²⁺/2.

5.2.12 Umwandlung der TFA-Salze in Hydrochloride

Die Verbindungen **2**, **4**, **70** und **106** (alle nach der Synthese als TFA-Salze erhalten) wurden für die Mäusestudien nach einer bekannten Methode (Andrushchenko et al., 2007) in die entsprechenden Hydrochloride (**110-113**) überführt, um mögliche durch TFA verursachte Nebenwirkungen auszuschließen.

Zu Beginn wurde eine HCl-Lösung (100 mmol/L in Reinstwasser) hergestellt. Zwei Proben von jeweils 101.46 mg (0.083 mmol) des Inhibitors **4** (mit vier basischen Gruppen) wurden in je 15 mL der HCl-Lösung gelöst. Dies entspricht einem etwa 4.5-fachen Überschuss an HCl gegenüber TFA (0.332 mmol TFA in 0.083 mmol der Verbindung **4**; 1.5 mmol HCl in 15 mL HCl-Lösung). Die

Inhibitorlösungen wurden sofort eingefroren und lyophilisiert. Die erste Probe diente der gravimetrischen Kontrolle, daraus wurde keine Substanz entnommen. Aus der zweiten Probe wurden kleine Mengen (ca. 10 mg) für die NMR-Analytik entnommen. Der ganze Vorgang wurde mit den gefriergetrockneten Proben noch zweimal wiederholt. Zum Schluss wurden die Proben einmal aus Reinstwasser (15 mL) lyophilisiert. Die Ergebnisse der analytischen Kontrollen sind in **Tabelle 18** zusammengefasst. In **Abbildung 43** sind die ^{19}F -NMR-Spektren dargestellt.

Tabelle 18: Analytischen Daten der Umwandlung des Inhibitors **4** in das entsprechende Hydrochlorid (**110**).

Vorgang	Analytische Methode		
	Gravimetrisch ³ (mg)	^{13}C -NMR	^{19}F -NMR ⁴
Vor Lyophilisation	101.5	TFA-Signale sichtbar	TFA-Signal sichtbar
1. Lyophilisation ¹	74.5	TFA-Signale unsichtbar	TFA-Signal sichtbar
2. Lyophilisation ¹	74.2	nicht gemessen	TFA-Signal sichtbar
3. Lyophilisation ¹	73.9	nicht gemessen	TFA-Signal kaum sichtbar
4. Lyophilisation ²	71.7	nicht gemessen	TFA-Signal unsichtbar

¹aus HCl (100 mmol/L)

²aus H₂O

³errechneter Sollwert nach kompletter Umwandlung des vierfachen TFA-Salzes: 75.5 mg

⁴zu jeder Probe wurden 2.5 µL Trifluorethanol (TFE, -76.56 ppm) hinzugegeben. Die Intensität des TFA-Signals (-75.34 ppm) wurde mit der Intensität des TFE-Signals verglichen.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die empfindlichste analytische Kontrolle der Umwandlung der Salze die ^{19}F -NMR-Spektroskopie ist, während die gravimetrische und die ^{13}C -NMR-Kontrolle, die auf eine komplette Umwandlung schon nach der ersten Lyophilisation hindeuten, weniger sensitiv und deswegen eher ungeeignet sind.

Die Umwandlung aller anderen TFA-Salze in Hydrochloride erfolgte nach identischem Prinzip, jedoch ohne NMR-Analytik, da sich diese Methode bereits im Falle des Inhibitors **4** als erfolgreich erwiesen hatte.

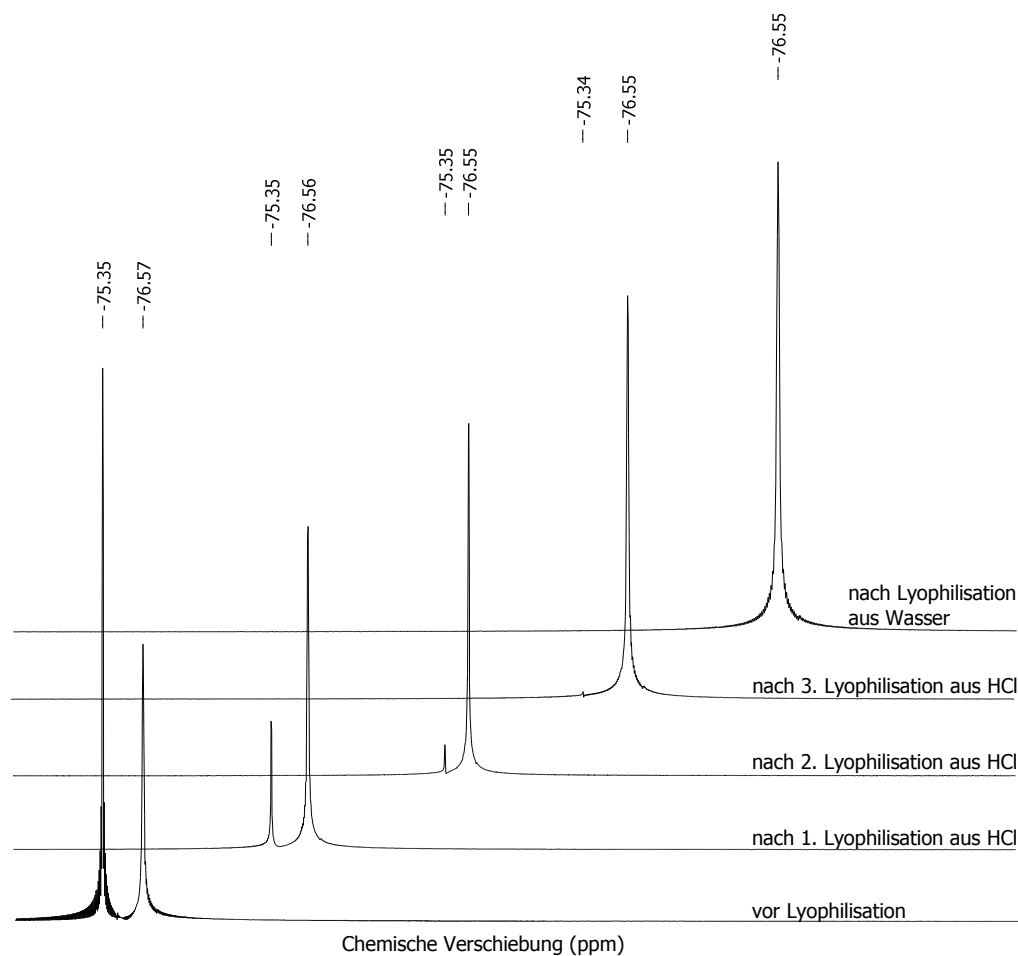


Abbildung 43: Umwandlung des TFA-Salzes des Inhibitors **4** in das entsprechende HCl-Salz (Derivat **110**). ^{19}F -NMR-Spektren der Verbindung **4** als TFA-Salz (vor Lyophilisation) sowie nach mehrmaliger Lyophilisierung aus HCl und abschließend aus Wasser (Verbindung **110** als HCl-Salz). Jede Probe enthält ca. 10 mg von dem jeweiligen Salz und 2.5 μL TFE, gelöst in 0.7 mL D_2O (Signale: TFA: -75.35 ppm; TFE: -76.56 ppm).

Inhibitor 110 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba \times 4 HCl (aus Inhibitor **4**)

Ausbeute: 71.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.6; **Reinheit:** 99 %.

Inhibitor 111 Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba \times 3 HCl (aus Inhibitor **2**)

Ausbeute: 19.7 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 26.4; **Reinheit:** 98 %.

Inhibitor 112 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Benzylamid \times 3 HCl (aus Inhibitor **70**)

Ausbeute: 9.6 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 28.9; **Reinheit:** 99 %.

Inhibitor 113 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba \times 4 HCl (aus Inhibitor **106**)

Ausbeute: 13.8 mg, weißes Pulver; **HPLC (% B):** 20.3; **Reinheit:** 99 %.

5.3 Enzymkinetische Messungen

Sämtliche enzymkinetischen Messungen wurden bei RT in einem Fluoreszenz-Plattenleser Tecan Safire 2 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und die Stammlösungen (10 mmol/L) bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Konzentrationen dieser Lösungen wurden unter der Annahme berechnet, dass jede basische Gruppe der Inhibitoren ein TFA als Gegenion trägt.

5.3.1 Enzymkinetische Messungen mit der Proproteinkonvertase Furin

Alle Messungen mit Furin erfolgten in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland). Die Zusammensetzung des standardmäßig verwendeten Messansatzes ist in **Tabelle 19** dargestellt.

Tabelle 19: Messansatz für die enzymkinetischen Messungen mit Furin.

Volumen (μL)	Reagenz
2 ¹	Inhibitorlösung (in DMSO)
20	Substratlösung (in H_2O)
160	Furin-Puffer (100 mmol/L HEPES, 0.2 % (w/v) Triton X-100, 2 mmol/L CaCl_2 , 0,02 % (w/v) Natriumazid und 1 mg/mL BSA; pH 7.0, eingestellt durch Zugabe von NaOH, 2 mol/L)
20	Enzymlösung in Furin-Puffer (0.95 nmol/L Furin im Messansatz)

¹nur bei Vermessung der Inhibitoren; nicht bei der Substratcharakterisierung;

Die Reaktion der enzymatischen AMC-Substratspaltung mit und ohne Inhibitor wurde durch Zugabe der Furinlösung gestartet und über einen Zeitraum von ca. 25 min verfolgt. Als Substrat diente standardmäßig die Verbindung **7** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) (Becker, 2011). Bei jeder Messung wurde die Aktivität des Enzyms in Abwesenheit eines Inhibitors bei variierenden Substratkonzentrationen geprüft. Dabei wurden die Parameter V_{max} (in RFU/s, RFU = relative Fluoreszenzeinheit) und K_M (in $\mu\text{mol/L}$) durch Anpassung der Geschwindigkeitswerte an die Michaelis-Menten-Gleichung (**Gleichung 6**) bestimmt.

Gleichung 6: Michaelis-Menten-Gleichung (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante).

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times [S]}{K_M + [S]}$$

5.3.1.1 Bestimmung der V_{\max} - und k_{cat}/K_M -Werte der AMC-Substrate

5.3.1.1.1 Bestimmung der V_{\max} - und K_M -Werte

Die Parameter V_{\max} und K_M für jedes Substrat wurden wie in **Kapitel 5.3.1** beschrieben bestimmt. Von jedem Substrat wurden acht verschiedene Konzentrationen vermessen, die höchste Konzentration im Messansatz betrug etwa $10 \times K_M$ (**Tabelle 20**). Die Enzymkonzentration betrug in allen Messansätzen 0.95 nmol/L.

Tabelle 20: Bedingungen für die Bestimmung der Parameter V_{\max} und K_M (Fuin-Konzentration: 0.95 nmol/L).

Nr.	Bereich der Substratkonzentrationen im Messansatz ($\mu\text{mol/L}$)
7	2.5 bis 50
8	2.5 bis 50
9	2.5 bis 50
10	0.5 bis 10
11	0.25 bis 5
12	0.5 bis 10
13	0.5 bis 10

5.3.1.1.2 Bestimmung der k_{cat} -Werte mittels einer AMC-Eichkurve

Die Fluoreszenz variierender AMC-Konzentrationen wurde gemessen. Durch Auftragung der Konzentrationen gegen die entsprechenden Fluoreszenzwerte wurde eine Eichgerade erstellt (Becker, 2011). Die Steigung dieser Geraden beträgt $44\,751 \text{ RFU} \times \text{L}/\mu\text{mol}$ und besagt, dass 1 $\mu\text{mol/L}$ AMC unter den gewählten Bedingungen eine Fluoreszenz von 44 751 RFU verursacht. Mithilfe dieses Wertes lässt sich der k_{cat} -Wert nach **Gleichung 7** berechnen.

Gleichung 7: Formel für die Berechnung des k_{cat} -Wertes eines Substrates mittels einer AMC-Eichkurve (k_{cat} : Wechselzahl; maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit; V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[E]_0$: Enzymkonzentration).

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{\text{Steigung der Eichkurve} \times [E]_0}$$

Durch Division dieses Wertes durch den jeweiligen K_M -Wert lässt sich der k_{cat}/K_M -Wert des entsprechenden Substrates bestimmen.

5.3.1.1.3 Bestimmung der k_{cat} - bzw. $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte durch Auswertung der Progresskurven

Die Messungen erfolgten nach beschriebenen Methoden (Neumann et al., 2004; Paschalidou et al., 2004; Stein, 1985) bei bekannter Enzymkonzentration und einer Substratkonzentration, die mindestens 10-mal niedriger als der K_{M} -Wert des entsprechenden Substrates war. Daher wurde je nach Substrat dessen Konzentration entsprechend des zuvor bestimmten K_{M} -Wertes ausgewählt. Die Enzymkonzentration wurde so angepasst, dass im Messzeitraum von etwa 50 min ein möglichst weitgehender Substratumsatz erfolgt (> zwei bis drei Halbwertszeiten), wodurch eine zuverlässige Anpassung der Messwerte an **Gleichung 8** für eine Reaktion nach erster Ordnung ermöglicht wird (**Abbildung 19**, S. 61.). Die dafür verwendeten Substrat- und Enzymkonzentrationen sind in **Tabelle 21** zusammengefasst.

Tabelle 21: Messbedingungen zur Progresskurvenanalyse.

Nr.	Substratkonzentration im Messansatz ($\mu\text{mol/L}$)	Enzymkonzentration im Messansatz (nmol/L)
7	0.2	19
8	0.2	19
9	0.2	19
10	0.06	19
11	0.02	0.95
12	0.06	0.95
13	0.06	0.95

Durch Anpassung der Progresskurven an **Gleichung 8** wurden die k_{obs} -Werte berechnet.

Gleichung 8: Formel für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} aus den Progresskurven der Substratspaltung nach einer Reaktion erster Ordnung (F_t : Fluoreszenz zum Zeitpunkt t ; F_{fin} : finale Fluoreszenz in der Plateau-Phase der Progresskurve; F_{init} : initiale Fluoreszenz zu Beginn der Messung; k_{obs} : scheinbare (apparente) Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung; t : Zeit).

$$F_t = (F_{\text{fin}} - F_{\text{init}}) \times (1 - e^{(-k_{\text{obs}} \times t)}) + F_{\text{init}}$$

Aus dem k_{obs} -Wert lässt sich der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert mittels **Gleichung 9** ermitteln und aus diesem Term bei bekanntem K_{M} -Wert der k_{cat} -Wert berechnen.

Gleichung 9: Formel für die Berechnung des k_{cat}/K_M -Wertes eines Substrates aus dem k_{obs} -Wert der Progresskurvenanalyse bei bekannter Enzymkonzentration (k_{obs} : scheinbare (apparente) Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung; $[E]_0$: Enzymkonzentration; k_{cat} : Wechselzahl; maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit; K_M : Michaelis-Menten-Konstante). Bei bekanntem K_M -Wert kann aus diesem Term k_{cat} berechnet werden.

$$\frac{k_{obs}}{[E]_0} = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

5.3.1.2 Bestimmung der K_i -Werte klassischer kompetitiver reversibler Inhibitoren

Bei diesen Messungen wurde die Inhibitorkonzentration im Messansatz um mehr als eine Größenordnung variiert. Dabei wurde die niedrigste Konzentration so gewählt, dass diese mindestens 10-mal höher als die eingesetzte Enzymkonzentration war. Dazu wurde jede Inhibitorkonzentration in Anwesenheit drei verschiedener Substratkonzentrationen (50, 20 und 5 $\mu\text{mol/L}$ der Verbindung **7** im Messansatz) vermessen. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (v) wurde durch lineare Regression der Progresskurven ermittelt. Der K_i -Wert wurde anschließend durch Anpassung der Geschwindigkeitswerte als Funktion der Inhibitorkonzentration an die Gleichung für kompetitive reversible Hemmung bestimmt (**Gleichung 10**).

Gleichung 10: Gleichung für die klassische kompetitive reversible Enzymhemmung (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; $[I]$: Inhibitorkonzentration; K_i : Inhibitionskonstante).

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

5.3.1.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Für Inhibitoren mit einem von dem klassischen kompetitiven Hemmmechanismus abweichenden Verhalten konnten durch die oben beschriebene Methode keine K_i -Werte ermittelt werden. In solchen Fällen wurden nur IC_{50} -Werte bestimmt. Für manche klassische Inhibitoren wurden ebenfalls IC_{50} -Werte ermittelt, um einen Vergleich zwischen den Wirksamkeiten der verschiedenen Inhibitoren zu ermöglichen.

Hierfür wurde der Bereich der verwendeten Inhibitorkonzentration etwas vergrößert (Variation um etwa vier Größenordnungen). Sämtliche Messungen erfolgten nur bei einer Konzentration von 12.5 $\mu\text{mol/L}$ des Substrates **7** im Ansatz. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (v)

wurde wiederum durch lineare Regression der Progresskurven ermittelt. Der IC_{50} -Wert wurde letztendlich durch Anpassung der Geschwindigkeitswerte als Funktion der Inhibitorkonzentration an **Gleichung 11** berechnet.

Gleichung 11: Gleichung zur Berechnung eines IC_{50} -Wertes nach einem Drei-Parameter-Modell (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; v_0 : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors bei der entsprechenden Substratkonzentration; $[I]$: Inhibitorkonzentration; IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration; p : Steilheit der Kurve).

$$v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^p}$$

Bei bekanntem Hemmmechanismus lässt sich der K_i -Wert eines Inhibitors auch direkt aus dem experimentell bestimmten IC_{50} -Wert berechnen. Im Falle der klassischen kompetitiven Hemmung geschieht dies mithilfe der **Gleichung 12** (Cheng and Prusoff, 1973; Naqui, 1983).

Gleichung 12: Zusammenhang zwischen dem K_i - und IC_{50} -Wert bei der klassischen kompetitiven reversiblen Enzymhemmung (K_i : Inhibitionskonstante; IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

5.3.1.4 Bestimmung der K_i -Werte der *tight-binding*-Inhibitoren

Sehr wirksame Inhibitoren mit K_i -Werten ≤ 0.1 nM wurden unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen (Copeland, 2005; Williams and Morrison, 1979). Die bei den Messungen eingesetzten Inhibitorkonzentrationen lagen in diesem Falle etwa im Bereich der Enzymkonzentration. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (v) wurde wiederum durch lineare Regression der Progresskurven ermittelt. Alle Geschwindigkeitswerte wurden in Anwesenheit nur einer Substratkonzentration (12.5 μ mol/L der Verbindung **7** im Ansatz) erhalten. Durch Anpassung der Geschwindigkeitswerte als Funktion der Inhibitorkonzentration an die Morrison-Gleichung (**Gleichung 13**) wurde der scheinbare (apparente) K_i -Wert (K_i^{app}) berechnet.

Gleichung 13: Variante der Morrison-Gleichung (v : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion; v_0 : Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors bei der entsprechenden Substratkonzentration; K_i^{app} : apparente Inhibitionskonstante; $[I]_t$: totale InhibitorKonzentration; $[E]_t$: totale Enzymkonzentration).

$$v = v_0 \times \frac{\left[(K_i^{app} + [I]_t - [E]_t)^2 + 4 K_i^{app} [E]_t \right]^{1/2} - (K_i^{app} + [I]_t - [E]_t)}{2 [E]_t}$$

Der K_i -Wert wurde letztendlich durch Division des apparenten K_i -Wertes durch den Substratschutzterm bestimmt (**Gleichung 14**).

Gleichung 14: Formel zur Berechnung des K_i -Wertes eines *tight-binding*-Inhibitors (K_i : Inhibitionskonstante; K_i^{app} : scheinbare (apparente) Inhibitionskonstante; $[S]$: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Menten-Konstante).

$$K_i = \frac{K_i^{app}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

5.3.1.4.1 Messungen mit dem Substrat 12: Umgehung der *tight-binding*-Bedingungen

Unter den Bedingungen, die standardmäßig für die Bestimmung der K_i -Werte klassischer kompetitiver reversibler Inhibitoren gewählt werden (Enzymkonzentration 0.95 nmol/L im Messansatz, Substrat 7, InhibitorKonzentration $\geq 10 \times$ Enzymkonzentration), hemmen manche Inhibitoren Furin so stark, dass praktisch keine enzymatische Umsetzung detektiert und dementsprechend kein K_i -Wert bestimmt werden kann. Solche Inhibitoren müssen unter *tight-binding*-Bedingungen vermessen werden. Diese Bedingungen sind jedoch besonders anfällig für Messfehler, da sie u.a. sehr empfindlich gegenüber Schwankungen in der Enzymkonzentration sind.

Durch die Verwendung des deutlich sensitiveren Substrates 12 konnten die *tight-binding*-Bedingungen für Vermessung von Inhibitoren mit K_i -Werten \geq ca. 10 pM umgangen werden. Das heißt, das neue Substrat wird so effizient durch Furin gespalten, dass sogar bei Anwendung sehr wirksamer Inhibitoren in Konzentrationen, die mindestens 10-mal höher als die Enzymkonzentration sind, immer noch ein ausreichendes Fluoreszenz-Signal detektiert wird. Dieses Substrat ermöglicht auch die Verwendung einer 10-mal niedrigeren Enzymkonzentration (0.095 nmol/L statt 0.95 nmol/L im Messansatz) sowie einer niedrigeren Substratkonzentration (10, 5 und 2.5 μ mol/L für die Verbindung 12 statt 50, 20 und 5 μ mol/L für die Verbindung 7 im Messansatz).

Ausgewählte *tight-binding*-Inhibitoren wurden wie in **Kapitel 5.3.1.2** beschrieben vermessen, jedoch mit dem Substrat **12** und mit einer Furinkonzentration von 0.095 nM im Messansatz. Die Hemmkonstanten wurden mithilfe von **Gleichung 10** berechnet. Die gemäß dieser neuen Methode erhaltenen K_i -Werte waren mit den unter *tight-binding*-Bedingungen bestimmten Werten vergleichbar (**Tabelle 14**, S. 87).

5.3.2 Enzymkinetische Messungen mit den Proroteinkonvertasen PC1/3 und PC2

Die Restaktivität der Enzyme PC1/3 und PC2 wurde in Anwesenheit ausgewählter Inhibitoren bestimmt. Aufgrund der limitierten verfügbaren Enzymmengen konnten keine genaueren Messungen zur Berechnung konkreter K_i -Werte durchgeführt werden. Für diese Enzyme wurden daher nur Restaktivitäten bei den angegebenen Inhibitorkonzentrationen im Vergleich zu Kontrollmessungen in Abwesenheit des Inhibitors bestimmt. Die exakte Konzentration dieser Enzyme war nicht bekannt. Um Messungen mit geringeren Enzymmengen zu ermöglichen, erfolgten die Messungen in einem reduzierten Ansatzvolumen von 50 μL in undurchsichtigen 96-*well*-Platten mit Rundboden (Costar Corning 3365; bezogen über die Firma VWR). Die exakten Messansätze sind in **Tabelle 22** dargestellt.

Tabelle 22: Messansatz für die enzymkinetischen Messungen mit PC1/3 und PC2.

Volumen (μL)	Reagenz	Konzentration im Messansatz
5	Inhibitorlösung ¹	1 oder 0.1 $\mu\text{mol/L}$
35	Enzymlösung in Puffer ²	ca. 0.005-0.02 g/L^3
10	Substratlösung in H_2O^4	200 $\mu\text{mol/L}$

¹Inhibitor-Stammlösungen in DMSO der Konzentration 10 mmol/L wurden mit dem jeweiligen Puffer für PC1/3 oder PC2 auf 10 oder 1 $\mu\text{mol/L}$ verdünnt. Dies ergab eine Konzentration von 1 bzw. 0.1 $\mu\text{mol/L}$ im Messansatz.

²**PC1/3-Puffer:** 100 mmol/L Natriumacetat, 5 mmol/L CaCl_2 , 0.1 % (w/v) Brij 35, 0.1 % (w/v) NaN_3 und 0.01 % (w/v) BSA, pH 5.5, eingestellt durch Zugabe von HCl, 2 mol/L; **PC2-Puffer:** 100 mmol/L Natriumacetat, 2 mmol/L CaCl_2 , 0.1 % (w/v) Brij 35, 0.1 % (w/v) NaN_3 und 0.01 % (w/v) BSA, pH 5.0, eingestellt durch Zugabe von HCl, 2 mol/L; **Enzymlösung in Puffer:** Stammlösung des Enzyms um den Faktor 14 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt;

³Die genauen Enzymkonzentrationen sind nicht bekannt. Nach Angabe von Prof. Dr. Iris Lindberg betragen die Konzentrationen der Stammlösungen beider Enzyme etwa 0.1-0.4 g/L . Die entsprechenden ungefähren Konzentrationen im Messansatz bei einem Gesamtvolumen von 50 μL sind in der Tabelle angegeben.

⁴Verbindung **7** diente als Substrat.

Die Inhibitorlösung wurde mit der Enzymlösung für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Hydrolyse durch Zugabe der Substratlösung gestartet und der Fluoreszenzanstieg über einen Zeitraum von etwa 1 h verfolgt. Die Progresskurven beider Enzyme zeigten trotz der Vorinkubation leichte parabolische Krümmungen. Aus diesem Grunde wurden nur die Werte von 500 bis 1 500 s (PC1/3) bzw. von 1 000 bis 2 000 s (PC2) für die Bestimmung der Geschwindigkeiten durch lineare Regression berücksichtigt. Der Geschwindigkeitswert der ungehemmten Enzymreaktion (ohne Inhibitor im Messansatz) wurde als 100 % Restaktivität festgelegt.

6 Literaturverzeichnis

- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., and van der Goot, F.G. (1998). The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* 273, 32656-32661.
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., and Thomas, G. (1993). Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem* 268, 24887-24891.
- Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., and Thomas, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16, 1508-1518.
- Andrushchenko, V.V., Vogel, H.J., and Prenner, E.J. (2007). Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides. *J Pept Sci* 13, 37-43.
- Angliker, H. (1995). Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* 38, 4014-4018.
- Angliker, H., Wikstrom, P., Shaw, E., Brenner, C., and Fuller, R.S. (1993). The synthesis of inhibitors for processing proteinases and their action on the Kex2 proteinase of yeast. *Biochem J* 293 (Pt 1), 75-81.
- Aronov, A.M. (2005). Predictive in silico modeling for hERG channel blockers. *Drug Discov Today* 10, 149-155.
- Atkins, G.J. (2013). The Pathogenesis of Alphaviruses. *ISRN Virology* 2013, 22.
- Babcock, J.J., and Li, M. (2013). hERG channel function: beyond long QT. *Acta Pharmacol Sin* 34, 329-335.
- Basak, A., Chen, A., Scamuffa, N., Mohottalage, D., Basak, S., and Khatib, A.M. (2010). Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* 17, 2214-2221.
- Basak, A., Cooper, S., Roberge, A.G., Banik, U.K., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1999). Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem J* 338 (Pt 1), 107-113.
- Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., and Klein-Szanto, A.J. (2001a). Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10326-10331.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A., and Klein-Szanto, A.J. (2001b). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* 31, 224-232.
- Becker, G.L. (2011). Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren.
- Becker, G.L., Harges, K., and Steinmetzer, T. (2011). New substrate analogue furin inhibitors derived from 4-amidinobenzylamide. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 4695-4697.
- Becker, G.L., Lu, Y., Harges, K., Strehlow, B., Levesque, C., Lindberg, I., Sandvig, K., Bakowsky, U., Day, R., Garten, W., *et al.* (2012). Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J Biol Chem* 287, 21992-22003.
- Becker, G.L., Sielaff, F., Than, M.E., Lindberg, I., Routhier, S., Day, R., Lu, Y., Garten, W., and Steinmetzer, T. (2010). Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* 53, 1067-1075.

- Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N.G. (2006). The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem* 281, 30561-30572.
- Bernatowicz, M.S., Wu, Y., and Matsueda, G.R. (1992). 1H-Pyrazole-1-carboxamide hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* 57, 2497-2502.
- Bernatowicz, M.S., Wu, Y., and Matsueda, G.R. (1993). Urethane protected derivatives of 1-guanylpurazole for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tetrahedron Letters* 34, 3389-3392.
- Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M.H., and Dubois, C.M. (1997). TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* 99, 1974-1983.
- Bontemps, Y., Scamuffa, N., Calvo, F., and Khatib, A.M. (2007). Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* 27, 631-648.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., and Fuller, R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* 269, 25830-25837.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A., and Lindberg, I. (2000). Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* 275, 36741-36749.
- Cao, J., Rehemtulla, A., Pavlaki, M., Kozarekar, P., and Chiarelli, C. (2005). Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-Golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. *J Biol Chem* 280, 10974-10980.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., and Rice, C.M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649-688.
- Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.
- Chiron, M.F., Fryling, C.M., and FitzGerald, D.J. (1994). Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* 269, 18167-18176.
- Clement, B. (2002). Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* 34, 565-579.
- Collier, R.J. (1975). Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 39, 54-85.
- Constam, D.B., and Robertson, E.J. (2000). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development* 127, 245-254.
- Copeland, R.A. (2005). Tight binding inhibition. In *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*, R.A. Copeland, ed. (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 178-213.
- Coppola, J.M., Bhojani, M.S., Ross, B.D., and Rehemtulla, A. (2008). A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* 10, 363-370.
- Couture, F., D'Anjou, F., Desjardins, R., Boudreau, F., and Day, R. (2012). Role of proprotein convertases in prostate cancer progression. *Neoplasia* 14, 1032-1042.

- Couture, F., Kwiatkowska, A., Dory, Y.L., and Day, R. (2015). Therapeutic uses of furin and its inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25, 379-396.
- Creemers, J.W., and Khatib, A.M. (2008). Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci* 13, 4960-4971.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., and Christian, J.L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17, 4735-4743.
- D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J.P., Latil, A., Bonnel, D., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2011). Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Transl Oncol* 4, 157-172.
- Dahms, S.O., Arciniega, M., Steinmetzer, T., Huber, R., and Than, M.E. (2016). Structure of the unliganded form of the proprotein convertase furin suggests activation by a substrate-induced mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11196-11201.
- Dahms, S.O., Harges, K., Becker, G.L., Steinmetzer, T., Brandstetter, H., and Than, M.E. (2014). X-ray structures of human furin in complex with competitive inhibitors. *ACS Chem Biol* 9, 1113-1118.
- Dahms, S.O., Jiao, G.S., and Than, M.E. (2017). Structural Studies Revealed Active Site Distortions of Human Furin by a Small Molecule Inhibitor. *ACS Chem Biol*.
- Dang, Q.D., and Di Cera, E. (1994). A simple activity assay for thrombin and hirudin. *J Protein Chem* 13, 367-373.
- de Curtis, I., and Simons, K. (1988). Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8052-8056.
- Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., and Kessler, H. (1999). N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem* 42, 3033-3040.
- DeWolfe, R.H., and Augustine, F.B. (1965). Mechanism of Hydrolysis of Ethyl Benzimidates in Acidic Solutions. *Journal of Organic Chemistry* 30, 699-702.
- Dick, G.W., Kitchen, S.F., and Haddow, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46, 509-520.
- Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55, 170-171.
- Dönnecke, D., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Steinmetzer, P., Schuster, M., Stürzebecher, U., Nicklisch, S., Stürzebecher, J., and Steinmetzer, T. (2007). From selective substrate analogue factor Xa inhibitors to dual inhibitors of thrombin and factor Xa. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 3322-3329.
- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287, 1960-1964.
- Durant, G.J., Roe, A.M., and Green, A.L. (1970). The chemistry of guanidines and their actions at adrenergic nerve endings. *Prog Med Chem* 7, 124-213.
- Eissler, S., Kley, M., Bachle, D., Loidl, G., Meier, T., and Samson, D. (2017). Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths. *J Pept Sci* 23, 757-762.
- Essalmani, R., Susan-Resiga, D., Chamberland, A., Abifadel, M., Creemers, J.W., Boileau, C., Seidah, N.G., and Prat, A. (2011). In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J Biol Chem* 286, 4257-4263.

- Feichtinger, K., Sings, H.L., Baker, T.J., Matthews, K., and Goodman, M. (1998a). Triurethane-protected guanidines and triflyldiurethane-protected guanidines: New reagents for guanidinylation reactions. *Journal of Organic Chemistry* **63**, 8432-8439.
- Feichtinger, K., Zapf, C., Sings, H.L., and Goodman, M. (1998b). Diprotected triflylguanidines: A new class of guanidinylation reagents. *Journal of Organic Chemistry* **63**, 3804-3805.
- Fittler, H., Depp, A., Avrutina, O., Dahms, S.O., Than, M.E., Empting, M., and Kolmar, H. (2015). Engineering a Constrained Peptidic Scaffold towards Potent and Selective Furin Inhibitors. *Chembiochem* **16**, 2441-2444.
- Fuller, R.S., Brake, A.J., and Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-486.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **276**, 5836-5840.
- Gagnon, H., Beauchemin, S., Kwiatkowska, A., Couture, F., D'Anjou, F., Levesque, C., Dufour, F., Desbiens, A.R., Vaillancourt, R., Bernard, S., *et al.* (2014). Optimization of furin inhibitors to protect against the activation of influenza hemagglutinin H5 and Shiga toxin. *J Med Chem* **57**, 29-41.
- Garred, O., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* **270**, 10817-10821.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., and Klenk, H.D. (1994). Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **76**, 217-225.
- Garten, W., Stieneke, A., Shaw, E., Wikström, P., and Klenk, H.D. (1989). Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* **172**, 25-31.
- Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., and Tweten, R.K. (1997). Clostridium septicum alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect Immun* **65**, 4130-4134.
- Gouni-Berthold, I., Descamps, O.S., Fraass, U., Hartfield, E., Allcott, K., Dent, R., and Marz, W. (2016). Systematic review of published Phase 3 data on anti-PCSK9 monoclonal antibodies in patients with hypercholesterolaemia. *Br J Clin Pharmacol* **82**, 1412-1443.
- Guevara-Salazar, J.A., Quintana-Zavala, D., Jiménez-Vázquez, H.A., and Trujillo-Ferrara, J. (2014). Use of the harmonic mean to the determination of dissociation constants of stereoisomeric mixtures of biologically active compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem* **29**, 884-894.
- Hadfield, T.L., McEvoy, P., Polotsky, Y., Tzinserling, V.A., and Yakovlev, A.A. (2000). The pathology of diphtheria. *J Infect Dis* **181 Suppl 1**, S116-120.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361.
- Hancock, R.E., and Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**, 1551-1557.
- Hanson, S.R., and Harker, L.A. (1988). Interruption of acute platelet-dependent thrombosis by the synthetic antithrombin D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl chloromethyl ketone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3184-3188.
- Hardes, K. (2014). Synthese, Charakterisierung und Anwendung neuer Inhibitoren der Proproteinkonvertase Furin. Dissertation.

- Hardes, K., Becker, G.L., Lu, Y., Dahms, S.O., Köhler, S., Beyer, W., Sandvig, K., Yamamoto, H., Lindberg, I., Walz, L., *et al.* (2015). Novel Furin Inhibitors with Potent Anti-infectious Activity. *ChemMedChem* *10*, 1218-1231.
- Hardes, K., Ivanova, T., Thaa, B., McInerney, G.M., Klock, T.I., Sandvig, K., Künzel, S., Lindberg, I., and Steinmetzer, T. (2017). Elongated and Shortened Peptidomimetic Inhibitors of the Proprotein Convertase Furin. *ChemMedChem* *12*, 613-620.
- Hauel, N.H., Nar, H., Priepke, H., Ries, U., Stassen, J.M., and Wienen, W. (2002). Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* *45*, 1757-1766.
- Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E.A., and Li, F. (2014). Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* *5*, e00031-00014.
- Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* *157*, 195-206.
- Henneke, I., Greschus, S., Savai, R., Korfei, M., Markart, P., Mahavadi, P., Schermuly, R.T., Wygrecka, M., Stürzebecher, J., Seeger, W., *et al.* (2010). Inhibition of urokinase activity reduces primary tumor growth and metastasis formation in a murine lung carcinoma model. *Am J Respir Crit Care Med* *181*, 611-619.
- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., and Than, M.E. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* *10*, 520-526.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., and Than, M.E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol* *345*, 211-227.
- Hill, A.V. (1913). The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I. *Biochem J* *7*, 471-480.
- Hinkes, S., Wuttke, A., Saupe, S.M., Ivanova, T., Wagner, S., Knörlein, A., Heine, A., Klebe, G., and Steinmetzer, T. (2016). Optimization of Cyclic Plasmin Inhibitors: From Benzamidines to Benzylamines. *J Med Chem* *59*, 6370-6386.
- Hopkins, A.L., and Groom, C.R. (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* *1*, 727-730.
- http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en (2017).
- <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm> (2017).
- Huang, K.H., Mangette, J., Barta, T., Hall, S.E., Veal, J., and Hughes, P. (2008). Benzene, Pyridine, and Pyridazine Derivatives. US 2008/0119457 A1.
- Huang, Y.H., Lin, K.H., Liao, C.H., Lai, M.W., Tseng, Y.H., and Yeh, C.T. (2012). Furin overexpression suppresses tumor growth and predicts a better postoperative disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* *7*, e40738.
- Inocencio, N.M., Moehring, J.M., and Moehring, T.J. (1994). Furin activates Pseudomonas exotoxin A by specific cleavage in vivo and in vitro. *J Biol Chem* *269*, 31831-31835.
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* *431*, 931-945.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G., and Lazure, C. (1995). Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem* *270*, 19225-19231.

- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J., and Thomas, G. (1998). α 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7293-7298.
- Jiao, G.S., Cregar, L., Wang, J., Millis, S.Z., Tang, C., O'Malley, S., Johnson, A.T., Sareth, S., Larson, J., and Thomas, G. (2006). Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19707-19712.
- Jin, W., Fuki, I.V., Seidah, N.G., Benjannet, S., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2005). Proprotein convertases are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem* 280, 36551-36559.
- Joullié, M.M., and Lassen, K.M. (2010). Evolution of amide bond formation *ARKIVOC* viii, 189-250.
- Judkins, B.D., Allen, D.G., Cook, T.A., Evans, B., and Sardharwala, T.E. (1996). A versatile synthesis of amidines from nitriles via amidoximes. *Synth Comm* 26, 4351-4367.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* 37, 1075-1089.
- Junqueira, R.G., Silva, E., and Mares-Guia, M. (1992). Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Braz J Med Biol Res* 25, 873-887.
- Kacprzak, M.M., Peinado, J.R., Than, M.E., Appel, J., Henrich, S., Lipkind, G., Houghten, R.A., Bode, W., and Lindberg, I. (2004). Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* 279, 36788-36794.
- Kaiser, B., Hauptmann, J., and Markwardt, F. (1987). The pharmacodynamics of synthetic thrombin inhibitors of the basic type substituted n- α arylsulfonylated phenylalanine amide. *Pharmazie* 42, 119-121.
- Kaufmann, J.E., Irminger, J.C., and Halban, P.A. (1995). Sequence requirements for proinsulin processing at the B-chain/C-peptide junction. *Biochem J* 310 (Pt 3), 869-874.
- Khazdooz, L., Zarei, A., Aghaei, H., Azizi, G., and Gheisari, M.M. (2016). An efficient and selective method for the iodination and bromination of alcohols under mild conditions. *Tetrahedron Letters* 57, 168-171.
- Kheradmand, F., Rishi, K., and Werb, Z. (2002). Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci* 115, 839-848.
- Kim, B.C., Hwang, S.Y., Lee, T.H., Chang, J.H., Choi, H.W., Lee, K.W., Choi, B.S., Kim, Y.K., Lee, J.H., Kim, W.S., *et al.* (2006). Development of a scalable synthetic route towards a thrombin inhibitor, LB30057. *Org Process Res Dev* 10, 881-886.
- Kim, Y.A., Sharon, A., Chu, C.K., Rais, R.H., Al Safarjalani, O.N., Naguib, F.N., and el Kouni, M.H. (2007). Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of N6-benzyladenosine analogues as potential anti-toxoplasma agents. *Biochem Pharmacol* 73, 1558-1572.
- Klebe, G. (2009). Wie wirken Arzneistoffe: Angriffspunkte für eine Therapie. In *Wirkstoffdesign - Entwurf und Entwicklung von Arzneistoffen*, G. Klebe, ed. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag), pp. 335-349.
- Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., and Leppla, S.H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10277-10281.

- Komiyama, T., Coppola, J.M., Larsen, M.J., van Dort, M.E., Ross, B.D., Day, R., Rehemtulla, A., and Fuller, R.S. (2009). Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules. *J Biol Chem* 284, 15729-15738.
- Komiyama, T., and Fuller, R.S. (2000). Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry* 39, 15156-15165.
- Kotthaus, J., Steinmetzer, T., van de Locht, A., and Clement, B. (2011). Analysis of highly potent amidine containing inhibitors of serine proteases and their N-hydroxylated prodrugs (amidoximes). *J Enzyme Inhib Med Chem* 26, 115-122.
- Kouretova, J., Hammamy, M.Z., Epp, A., Hardes, K., Kallis, S., Zhang, L., Hilgenfeld, R., Bartenschlager, R., and Steinmetzer, T. (2017). Effects of NS2B-NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32, 712-721.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C., and Fuller, R.S. (1999). Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* 274, 23229-23234.
- Kwiatkowska, A., Couture, F., Levesque, C., Ly, K., Beauchemin, S., Desjardins, R., Neugebauer, W., Dory, Y.L., and Day, R. (2016). Novel Insights into Structure-Activity Relationships of N-Terminally Modified PACE4 Inhibitors. *ChemMedChem* 11, 289-301.
- Kwiatkowska, A., Couture, F., Levesque, C., Ly, K., Desjardins, R., Beauchemin, S., Prahl, A., Lammek, B., Neugebauer, W., Dory, Y.L., *et al.* (2014). Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a potent PACE4 inhibitor. *J Med Chem* 57, 98-109.
- Lättig-Tünnemann, G., Prinz, M., Hoffmann, D., Behlke, J., Palm-Apergi, C., Morano, I., Herce, H.D., and Cardoso, M.C. (2011). Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nat Commun* 2, 453.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A., and Thomas, G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* 267, 14304-14308.
- Lee, J.E., and Saphire, E.O. (2009). Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol* 4, 621-635.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Lei, J., Hansen, G., Nitsche, C., Klein, C.D., Zhang, L., and Hilgenfeld, R. (2016). Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science* 353, 503-505.
- Lepek, T., Kwiatkowska, A., Couture, F., Ly, K., Desjardins, R., Dory, Y., Prahl, A., and Day, R. (2017). Macrocyclization of a potent PACE4 inhibitor: Benefits and limitations. *Eur J Cell Biol*.
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G., Wengler, G., and Rey, F.A. (2001). The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137-148.
- Leskovac, V. (2003a). Hyperbolic and parabolic inhibition. In *Comprehensive enzyme kinetics*, V. Leskovac, ed. (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers), pp. 95-110.
- Leskovac, V. (2003b). Linear inhibition. In *Comprehensive enzyme kinetics*, V. Leskovac, ed. (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers), pp. 73-94.
- Lim, S.P., and Shi, P.Y. (2013). West Nile virus drug discovery. *Viruses* 5, 2977-3006.

- Lin, H., Ah Kioon, M.D., Lalou, C., Larghero, J., Launay, J.M., Khatib, A.M., and Cohen-Solal, M. (2012). Protective role of systemic furin in immune response-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 64, 2878-2886.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. (2007). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In Fields' virology, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1101-1152.
- Liu, Z.X., Fei, H., and Chi, C.W. (2004). Two engineered eglin c mutants potently and selectively inhibiting kexin or furin. *FEBS Lett* 556, 116-120.
- López-Vallejo, F., and Martínez-Mayorga, K. (2012). Furin inhibitors: importance of the positive formal charge and beyond. *Bioorg Med Chem* 20, 4462-4471.
- Lopez de Cicco, R., Bassi, D.E., Zucker, S., Seidah, N.G., and Klein-Szanto, A.J. (2005). Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. *Cancer Res* 65, 4162-4171.
- Lorey, S., Stöckel-Maschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M.D., Kähne, T., Mrestani-Klaus, C., Wrenger, S., Reinhold, D., *et al.* (2003). Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. *Eur J Biochem* 270, 2147-2156.
- Louagie, E., Taylor, N.A., Flamez, D., Roebroek, A.J., Bright, N.A., Meulemans, S., Quintens, R., Herrera, P.L., Schuit, F., Van de Ven, W.J., *et al.* (2008). Role of furin in granular acidification in the endocrine pancreas: identification of the V-ATPase subunit Ac45 as a candidate substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12319-12324.
- Lu, W., Zhang, W., Molloy, S.S., Thomas, G., Ryan, K., Chiang, Y., Anderson, S., and Laskowski, M., Jr. (1993). Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J Biol Chem* 268, 14583-14585.
- Lu, Y., Harges, K., Dahms, S.O., Böttcher-Friebertshäuser, E., Steinmetzer, T., Than, M.E., Klenk, H.D., and Garten, W. (2015). Peptidomimetic furin inhibitor MI-701 in combination with oseltamivir and ribavirin efficiently blocks propagation of highly pathogenic avian influenza viruses and delays high level oseltamivir resistance in MDCK cells. *Antiviral Res* 120, 89-100.
- Luo, D., Vasudevan, S.G., and Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res* 118, 148-158.
- Machen, T.E., Leigh, M.J., Taylor, C., Kimura, T., Asano, S., and Moore, H.P. (2003). pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C205-214.
- Madala, P.K., Tyndall, J.D., Nall, T., and Fairlie, D.P. (2010). Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem Rev* 110, Pr1-31.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Graslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011, 414729.
- Maraganore, J.M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K.L., and Fenton, J.W., 2nd (1990). Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* 29, 7095-7101.
- Mas, V., and Melero, J.A. (2013). Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. *Subcell Biochem* 68, 467-487.
- Mbikay, M., Sirois, F., Yao, J., Seidah, N.G., and Chretien, M. (1997). Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer* 75, 1509-1514.

- McBride, J.D., Watson, E.M., Brauer, A.B., Jaulent, A.M., and Leatherbarrow, R.J. (2002). Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. *Biopolymers* 66, 79-92.
- McDermott, J.S., Salmen, H.J., Cox, B.F., and Gintant, G.A. (2002). Importance of species selection in arrhythmogenic models of Q-T interval prolongation. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 938-939.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17, 850-860.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F., and Thomas, G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* 9, 28-35.
- Moroder, L., Hallett, A., Wunsch, E., Keller, O., and Wersin, G. (1976). [Di-tert.-butyl-dicarbonate, a useful tert.-Butyloxycardonylating reagent (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357, 1651-1653.
- Moulard, M., and Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 1469, 121-132.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 (Pt 3), 625-635.
- Naqui, A. (1983). What does I50 mean? *Biochem J* 215, 429-430.
- Neumann, U., Kubota, H., Frei, K., Ganu, V., and Leppert, D. (2004). Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme. *Anal Biochem* 328, 166-173.
- Neunhoeffer, H., and Weischedel, F. (1971). Synthese von Amidrazonen aus Amidinen. *Liebigs Ann Chem* 749, 16-23.
- Oda, K. (2012). New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J Biochem* 151, 13-25.
- Oh, D., Nasrolahi Shirazi, A., Northup, K., Sullivan, B., Tiwari, R.K., Bisoffi, M., and Parang, K. (2014a). Enhanced cellular uptake of short polyarginine peptides through fatty acylation and cyclization. *Mol Pharm* 11, 2845-2854.
- Oh, D., Sun, J., Nasrolahi Shirazi, A., LaPlante, K.L., Rowley, D.C., and Parang, K. (2014b). Antibacterial activities of amphiphilic cyclic cell-penetrating peptides against multidrug-resistant pathogens. *Mol Pharm* 11, 3528-3536.
- Opal, S.M., Artenstein, A.W., Cristofaro, P.A., Jung, J.W., Palardy, J.E., Parejo, N.A., and Lim, Y.P. (2005). Inter-alpha-inhibitor proteins are endogenous furin inhibitors and provide protection against experimental anthrax intoxication. *Infect Immun* 73, 5101-5105.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996.
- Ozden, S., Lucas-Hourani, M., Ceccaldi, P.E., Basak, A., Valentine, M., Benjannet, S., Hamelin, J., Jacob, Y., Mamchaoui, K., Mouly, V., *et al.* (2008). Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem* 283, 21899-21908.

- Pallottini, V., Marino, M., and Ascenzi, P. (2002). Clonidine displacement from type 1 imidazoline receptor by p-aminobenzamidine, the prototype of trypsin-like serine protease inhibitors. *IUBMB Life* 54, 301-304.
- Pappenheimer, A.M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46, 69-94.
- Paschalidou, K., Neumann, U., Gerhartz, B., and Tzougraki, C. (2004). Highly sensitive intramolecularly quenched fluorogenic substrates for renin based on the combination of L-2-amino-3-(7-methoxy-4-coumaryl)propionic acid with 2,4-dinitrophenyl groups at various positions. *Biochem J* 382, 1031-1038.
- Peternel, L., Stempelj, M., Cerne, M., Zega, A., Obreza, A., Oblak, M., Drevensek, G., Budihna, M.V., Stanovnik, L., and Urleb, U. (2006). Direct thrombin inhibitors built on the azaphenylalanine scaffold provoke degranulation of mast cells. *Thromb Haemost* 95, 294-300.
- Petersen, L.R., Jamieson, D.J., and Honein, M.A. (2016). Zika Virus. *N Engl J Med* 375, 294-295.
- Phoo, W.W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M.Y., Loh, Y.R., Tan, Y.B., Ng, E.Y., Lescar, J., Kang, C., and Luo, D. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat Commun* 7, 13410.
- Podsiadlo, P., Komiyama, T., Fuller, R.S., and Blum, O. (2004). Furin inhibition by compounds of copper and zinc. *J Biol Chem* 279, 36219-36227.
- Pond, A.L., and Nerbonne, J.M. (2001). ERG proteins and functional cardiac I(Kr) channels in rat, mouse, and human heart. *Trends in cardiovascular medicine* 11, 286-294.
- Qian, Z., Liu, T., Liu, Y.Y., Briesewitz, R., Barrios, A.M., Jhiang, S.M., and Pei, D. (2013). Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. *ACS Chem Biol* 8, 423-431.
- Qian, Z., Martyna, A., Hard, R.L., Wang, J., Appiah-Kubi, G., Coss, C., Phelps, M.A., Rossman, J.S., and Pei, D. (2016). Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* 55, 2601-2612.
- Quan, M.L., Lam, P.Y., Han, Q., Pinto, D.J., He, M.Y., Li, R., Ellis, C.D., Clark, C.G., Teleha, C.A., Sun, J.H., *et al.* (2005). Discovery of 1-(3'-aminobenzisoxazol-5'-yl)-3-trifluoromethyl-N-[2-fluoro-4-[(2'-dimethylaminomethyl)imidazol-1-yl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide hydrochloride (razaxaban), a highly potent, selective, and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Med Chem* 48, 1729-1744.
- Ramos-Molina, B., Lick, A.N., Nasrolahi Shirazi, A., Oh, D., Tiwari, R., El-Sayed, N.S., Parang, K., and Lindberg, I. (2015). Cationic Cell-Penetrating Peptides Are Potent Furin Inhibitors. *PLoS One* 10, e0130417.
- Rashad, A.A., Mahalingam, S., and Keller, P.A. (2014). Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *J Med Chem* 57, 1147-1166.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 44, D343-350.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42, D503-509.
- Reissmann, S. (2014). Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J Pept Sci* 20, 760-784.
- Remacle, A.G., Gawlik, K., Golubkov, V.S., Cadwell, G.W., Liddington, R.C., Cieplak, P., Millis, S.Z., Desjardins, R., Routhier, S., Yuan, X.W., *et al.* (2010). Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 987-995.

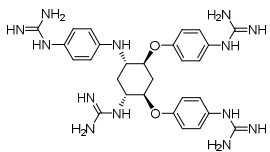
- Riegel, P., Ruimy, R., de Briel, D., Prevost, G., Jehl, F., Christen, R., and Monteil, H. (1995). Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. *FEMS Microbiol Lett* *126*, 271-276.
- Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T., and Fuller, R.S. (2002). Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* *102*, 4525-4548.
- Roebroek, A.J., Taylor, N.A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W.J., Hartmann, D., and Creemers, J.W. (2004). Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* *279*, 53442-53450.
- Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J., and Constam, D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* *125*, 4863-4876.
- Saiz, J.C., Vázquez-Calvo, A., Blázquez, A.B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., and Martín-Acebes, M.A. (2016). Zika Virus: the Latest Newcomer. *Frontiers in microbiology* *7*, 496.
- Sanguinetti, M.C., and Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* *440*, 463-469.
- Sarac, M.S., Cameron, A., and Lindberg, I. (2002). The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in vivo. *Infect Immun* *70*, 7136-7139.
- Sarac, M.S., Peinado, J.R., Leppla, S.H., and Lindberg, I. (2004). Protection against anthrax toxemia by hexa-D-arginine in vitro and in vivo. *Infect Immun* *72*, 602-605.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* *27*, 157-162.
- Schiebel, J., Gaspari, R., Sandner, A., Ngo, K., Gerber, H.D., Cavalli, A., Ostermann, A., Heine, A., and Klebe, G. (2017). Charges Shift Protonation: Neutron Diffraction Reveals that Aniline and 2-Aminopyridine Become Protonated Upon Binding to Trypsin. *Angew Chem Int Ed Engl* *56*, 4887-4890.
- Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J., and Steinmetzer, T. (2006). New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* *2*, 349-361.
- Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 1111-1125.
- Seidah, N.G., and Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 367-383.
- Sielaff, F., Than, M.E., Bevec, D., Lindberg, I., and Steinmetzer, T. (2011). New furin inhibitors based on weakly basic amidinohydrazones. *Bioorg Med Chem Lett* *21*, 836-840.
- Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* *69*, 531-569.
- Sounni, N.E., Baramova, E.N., Munaut, C., Maquoi, E., Frankenne, F., Foidart, J.M., and Noel, A. (2002). Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *Int J Cancer* *98*, 23-28.
- Sperl, S., Jacob, U., Arroyo de Prada, N., Stürzebecher, J., Wilhelm, O.G., Bode, W., Magdolen, V., Huber, R., and Moroder, L. (2000). (4-aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5113-5118.



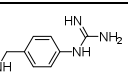
- Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71, 8475-8481.
- Stein, R.L. (1985). Catalysis by human leukocyte elastase: III. Steady-state kinetics for the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *Arch Biochem Biophys* 236, 677-680.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., and Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157, 697-700.
- Stone, S.R., and Hofsteenge, J. (1986). Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* 25, 4622-4628.
- Stone, S.R., and Maraganore, J.M. (1992). Hirudin interactions with thrombin. In *Thrombin: Structure and function*, L.J. Berliner, ed. (New York: Plenum Press), pp. 219-256.
- Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58, 491-562.
- Strongin, A., Pellecchia, M., and Barile, E. (2013). Inhibitors of furin and other pro-protein convertases. WO 2013/138666 A1.
- Thakkar, A., Trinh, T.B., and Pei, D. (2013). Global analysis of peptide cyclization efficiency. *ACS combinatorial science* 15, 120-129.
- Than, M.E., Henrich, S., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., and Bode, W. (2005). The endoprotease furin contains two essential Ca²⁺ ions stabilizing its N-terminus and the unique S1 specificity pocket. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 505-512.
- Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R., and Thorner, J. (1988). Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241, 226-230.
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N., and Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268, 26461-26465.
- van de Ven, W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Roebroek, A.J., and Siezen, R.J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* 14, 265-275.
- Ventura, E., Weller, M., and Burghardt, I. (2017). Cutting Edge: ERK1 Mediates the Autocrine Positive Feedback Loop of TGF-beta and Furin in Glioma-Initiating Cells. *J Immunol* 198, 4569-4574.
- Wang, H., Wang, H.S., and Liu, Z.P. (2011). Agents that induce pseudo-allergic reaction. *Drug discoveries & therapeutics* 5, 211-219.
- Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010). Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe* 7, 427-439.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13003-13008.
- White, J.M., Delos, S.E., Brecher, M., and Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 189-219.




















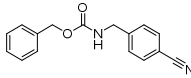
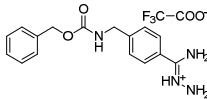
- White, J.M., and Whittaker, G.R. (2016). Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. *Traffic* 17, 593-614.
- Willems, W.R., Kaluza, G., Boschek, C.B., Bauer, H., Hager, H., Schutz, H.J., and Feistner, H. (1979). Semliki forest virus: cause of a fatal case of human encephalitis. *Science* 203, 1127-1129.
- Williams, J.W., and Morrison, J.F. (1979). The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzymol* 63, 437-467.
- Wu, Y., Yakar, S., Zhao, L., Hennighausen, L., and LeRoith, D. (2002). Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 62, 1030-1035.
- Wymore, R.S., Gintant, G.A., Wymore, R.T., Dixon, J.E., McKinnon, D., and Cohen, I.S. (1997). Tissue and species distribution of mRNA for the IKr-like K⁺ channel, *erg*. *Circ Res* 80, 261-268.
- Yamanishi, Y., Boyle, D.L., Clark, M., Maki, R.A., Tortorella, M.D., Arner, E.C., and Firestein, G.S. (2002). Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol* 168, 1405-1412.
- Zhang, L., Goldhammer, C., Henkel, B., Panhaus, G., Zuehl, F., Jung, G., and Bayer, E. (1994). "Magic mixture", a powerful solvent system for solid-phase synthesis of difficult peptides. In *Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, R. Epton, ed. (Birmingham, UK: Mayflower Worldwide, Ltd.), pp. 711-716.
- Zhang, X., Fugere, M., Day, R., and Kielian, M. (2003). Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. *J Virol* 77, 2981-2989.
- Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem* 274, 33913-33920.
- Zimmer, G., Budz, L., and Herrler, G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 276, 31642-31650.

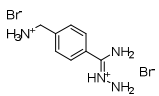
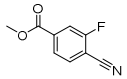
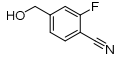
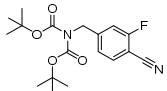
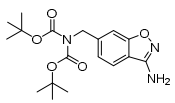
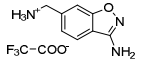
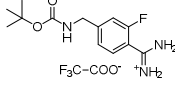
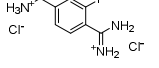
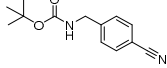
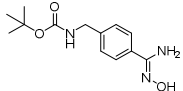
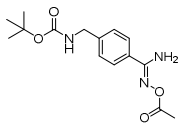
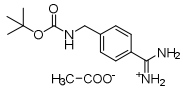
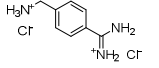
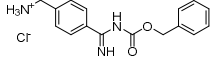
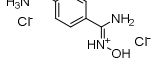
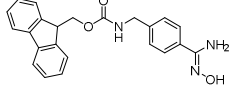
7 Anhang

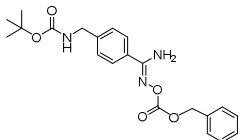
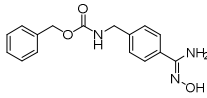
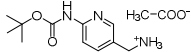
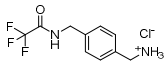

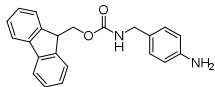
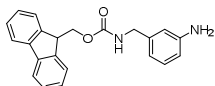
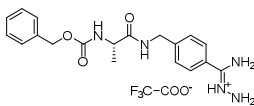
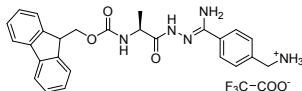
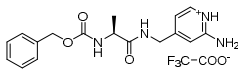
7.1 Verbindungen

Nr.	MI-Nr.	Sequenz/Struktur	Verweis
1	227	Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba×3 TFA	Abbildung 10, S. 20
2	1116	Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba×3 TFA	Abbildung 10, S. 20
3	701	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba×4 TFA	Abbildung 10, S. 20
4	1148	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba×4 TFA	Abbildung 10, S. 20
5			Tabelle 2, S. 21
6	52	3-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-Amba×4 TFA	Tabelle 2, S. 21
7	730	Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC×3 TFA	Tabelle 3, S. 60
8	1500	Phac-Arg-Val-Lys-Arg-AMC×3 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
9	1501	Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-AMC×3 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
10	1548	Phac-Arg-Tle-Lys-Arg-AMC×3 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
11	1549	Ac-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-AMC×4 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
12	1550	Ac-Arg-Arg-Tle-Arg-Arg-AMC×4 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
13	1551	Ac-Arg-Arg-Tyr-Lys-Arg-AMC×4 TFA	Schema 1, S. 33; Tabelle 3, S. 60
14	1507	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₃ -Lys)-Arg-4-Amba×5 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
15	1508	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₄ -Lys)-Arg-4-Amba×6 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
16	1509	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₅ -Lys)-Arg-4-Amba×7 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
17	1513	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₃ -Lys)-Lys-4-Amba×5 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
18	1514	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₄ -Lys)-Lys-4-Amba×6 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
19	1515	c(Suc-Phe-2-Nal-(Arg) ₅ -Lys)-Lys-4-Amba×7 TFA	Schema 2, S. 35; Tabelle 4, S. 66
20	1510	c(Arg) ₆ ×6 TFA	Schema 3, S. 37; Tabelle 5, S. 67
21	1511	c(Arg) ₈ ×8 TFA	Schema 3, S. 37;
22	1512	c(Arg) ₁₀ ×10 TFA	Tabelle 5, S. 67
23	1520	H-(Arg) ₆ -OH×7 TFA	Schema 3, S. 37;
24	1529	H-(Arg) ₈ -OH×9 TFA	Tabelle 5, S. 67
25	1521	H-(Arg) ₁₀ -OH×11 TFA	Schema 3, S. 37;
26	1502	Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Pro-NH ₂ ×3 TFA	Tabelle 6, S. 68

Nr.	MI-Nr.	Sequenz/Struktur	Verweis
27	1503	Phac-Arg-Val-Arg-Arg-Pro-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
28	1536	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
29	1537	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
30	1538	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
31	1539	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn-Val-NH ₂ × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
32	1541	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
33	1542	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Ala-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
34	1543	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Leu-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
35	1544	4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-rOrn-Val-NH ₂ × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
36	1562	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Gly-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
37	1563	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Lys-Gly-Val-NH ₂ × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
38	1564	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-Gly-Val-NH ₂ × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
39	1565	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-Ser-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
40	1566	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-3-AMe-Phac-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
41	1567	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-AMe-Phac-Val-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
42	1568	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-5-Ava-Val-Ser-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
43	1702	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-NH ₂ × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
44	1701	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Arg-OH × 4 TFA	Tabelle 6, S. 68
45	1584	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
46	1585	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Gly-OH × 3 TFA	Tabelle 6, S. 68
47	1546	4-GMe-Phac-Arg-Lys(Suc-4-Amba)-Arg-4-Amba × 5 TFA	Schema 4, S. 39; Tabelle 7, S. 72
48	1571	Ac-DLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-4-Amba × 3 TFA	Schema 4, S. 39; Tabelle 7, S. 72
49	1572	4-GMe-Phac-Arg-Lys(Gly-Leu-Leu-Leu-DLeu-Ac)-Lys-4-Amba × 4 TFA	Schema 4, S. 39; Tabelle 7, S. 72
50	1505	G-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 6 TFA	Schema 5, S. 42; Tabelle 8, S. 73
51	1506	G-Arg-Ala-Arg-Val-Arg-4-Amba × 5 TFA	Schema 5, S. 42; Tabelle 8, S. 73
52	1517	4-GMe-Phac-Arg-NH ₂ × 2 TFA	Tabelle 9, S. 74
53	1518	4-GMe-Phac-Arg-Tle-NH ₂ × 2 TFA	Tabelle 9, S. 74
54	1519	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH ₂ × 3 TFA	Tabelle 9, S. 74
55	1583	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-OH × 3 TFA	Tabelle 9, S. 74
56	1547	Phac-Arg-Val-Arg-  × 2 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 10, S. 78
57	1522	Phac-Arg-Val-Arg-  × 3 TFA	Schema 10, S. 50; Tabelle 10, S. 78
58	1523	Phac-Arg-Val-Arg-  × 3 TFA	Schema 10, S. 50; Tabelle 10, S. 78

Nr.	MI-Nr.	Sequenz/Struktur	Verweis
59	1524	Phac-Arg-Val-Arg  × 3 TFA	Schema 10, S. 50; Tabelle 10, S. 78
60	1525	Phac-Arg-Val-Arg  × 3 TFA	Schema 10, S. 50; Tabelle 10, S. 78
61	1532	Phac-Arg-Val-Arg  × 3 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 10, S. 78
62	1534	Phac-Arg-Val-Arg  × 3 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 10, S. 78
63	1552	Phac-Arg-Val-Arg  × 3 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 10, S. 78
64	1530	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 11, S. 80
65	1533	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 11, S. 80
66	1535	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 11, S. 80
67	1540	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 10, S. 50; Tabelle 11, S. 80
68	1553	4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 11, S. 80
69	1545	4-Ame-Phac-Arg-Val-Arg  × 4 TFA	Schema 10, S. 50
70	1516	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 3 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 12, S. 81
71	1556	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 12, S. 81
72	1555	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 12, S. 81
73	1558	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 4 TFA	Schema 11, S. 51; Tabelle 12, S. 81
74	1577	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 3 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 12, S. 81
75	1578	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 3 TFA	Schema 11, S. 51; Tabelle 12, S. 81
76	1579	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 4 TFA	Schema 9, S. 48; Tabelle 12, S. 81
77	1582	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg  × 3 TFA	Schema 11, S. 51; Tabelle 12, S. 81
78			Schema 6, S. 44
79			Schema 6, S. 44

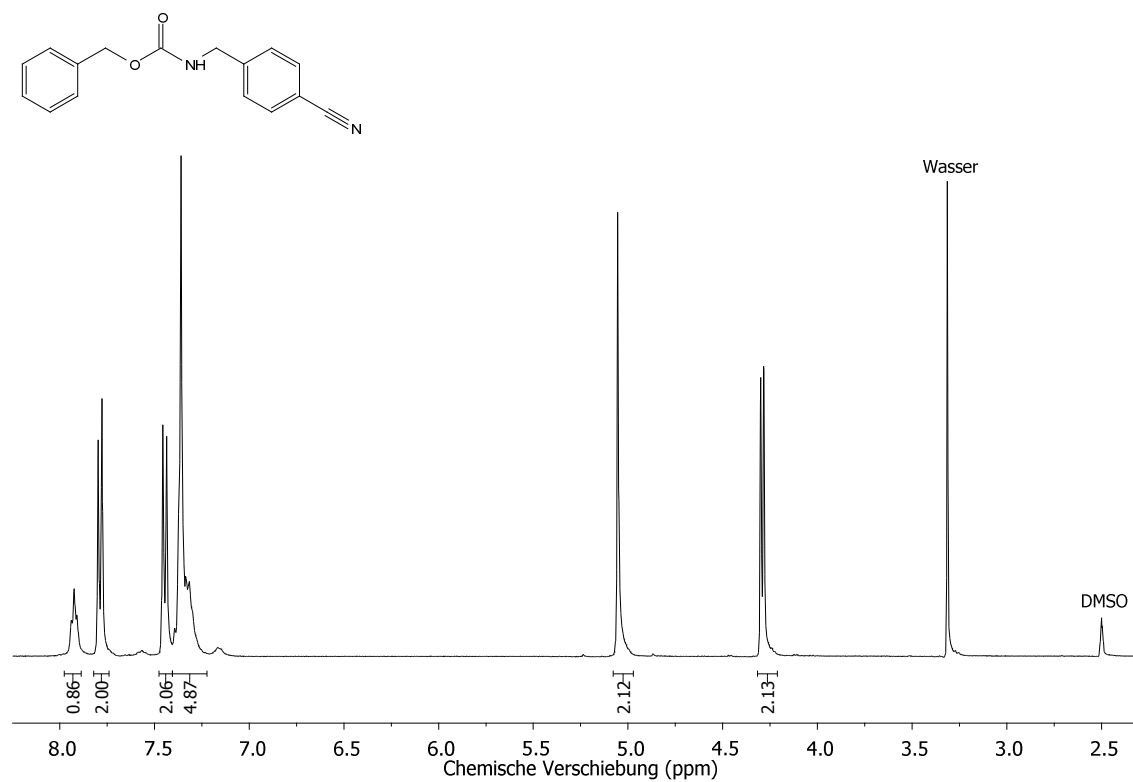
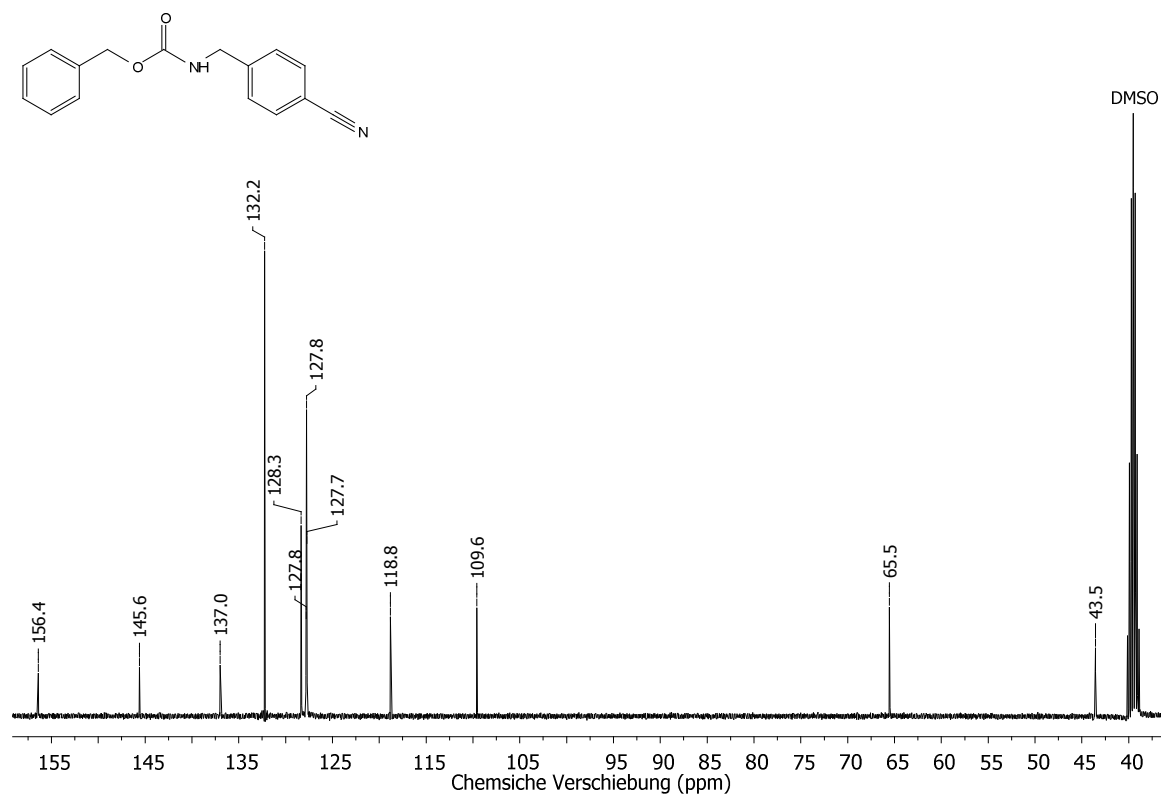
Nr.	MI-Nr.	Sequenz/Struktur	Verweis
80			Schema 6, S. 44
81			Schema 7, S. 45
82			Schema 7, S. 45
83			Schema 7, S. 45
84			Schema 7, S. 45
85			Schema 7, S. 45
86			Schema 7, S. 45
87			Schema 7, S. 45
88			
89			Schema 8, S. 47
90			
91			Schema 8, S. 47
92			Schema 8, S. 47
93			Schema 8, S. 47
94			Schema 8, S. 47
95			Schema 8, S. 47

Nr.	MI-Nr.	Sequenz/Struktur	Verweis
96			Schema 8, S. 47
97			Schema 8, S. 47
98			
99			
100			
101			
102			
103			Schema 12, S. 56
104			Schema 12, S. 56
105			Schema 12, S. 56
106	1554	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba × 4 TFA	Tabelle 13, S. 84
107	1700	Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba × 3 TFA	Tabelle 13, S. 84
108	1580	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-NH-CH2-Ph-N=N-OH × 4 TFA	Schema 11, S. 51; Tabelle 13, S. 84
109	1581	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-NH-CH2-Ph-CN × 3 TFA	Schema 11, S. 51; Tabelle 13, S. 84
110	1528	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 HCl	Tabelle 15, S. 125
111	1557	Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 3 HCl	Tabelle 15, S. 125
112	1569	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-NH-CH2-Ph × 3 HCl	Tabelle 15, S. 125
113	1570	4-GMe-Phac-Arg-Tle-Lys-4-Amba × 4 HCl	Tabelle 15, S. 125

7.2 Verwendete Messparameter des Tecan Safire 2

Parameter	Angabe/Wert/Einstellung
XFLUOR4 Version	V 4.51
Firmware	V 1.60 07/2006 Safire 2
Serial number	12904200017
Measurement mode	Fluorescence Top
Excitation wavelength	380 nm
Emission wavelength	460 nm
Excitation bandwidth	12 nm
Emission bandwidth	12 nm
Gain (Manual)	90
Number of reads	10
FlashMode	High sensitivity
Integration time	2000 μ s
Lag time	0 μ s
Plate definition file	NUN96ftNEW.pdf (Furin) bzw. COS96fw.pdf (PC1/3, PC2)
Z-Position (Manual)	7107 μ m
Number of kinetic cycles	40 (Furin) bzw. 120 (PC1/3, PC2)
Kinetic interval	34 s (Furin) bzw. 15 s (PC1/3, PC2)
Shake duration (Orbital Medium)	15 s
Target temperature	25 °C

7.3 NMR-Spektren

Abbildung 44: ¹H-Spektrum der Verbindung **78** (400 MHz, DMSO-d₆).Abbildung 45: ¹³C-Spektrum der Verbindung **78** (101 MHz, DMSO-d₆).

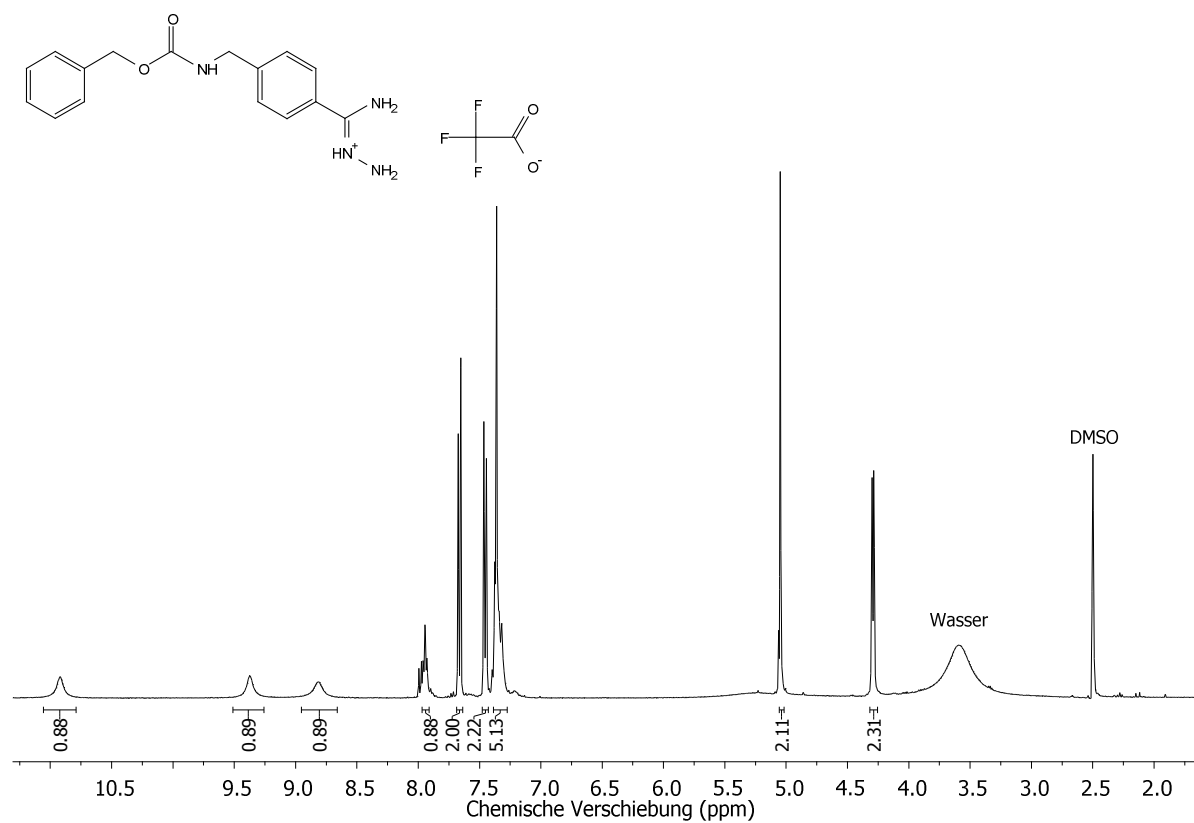


Abbildung 46: ¹H-Spektrum der Verbindung **79** (400 MHz, DMSO-d₆).

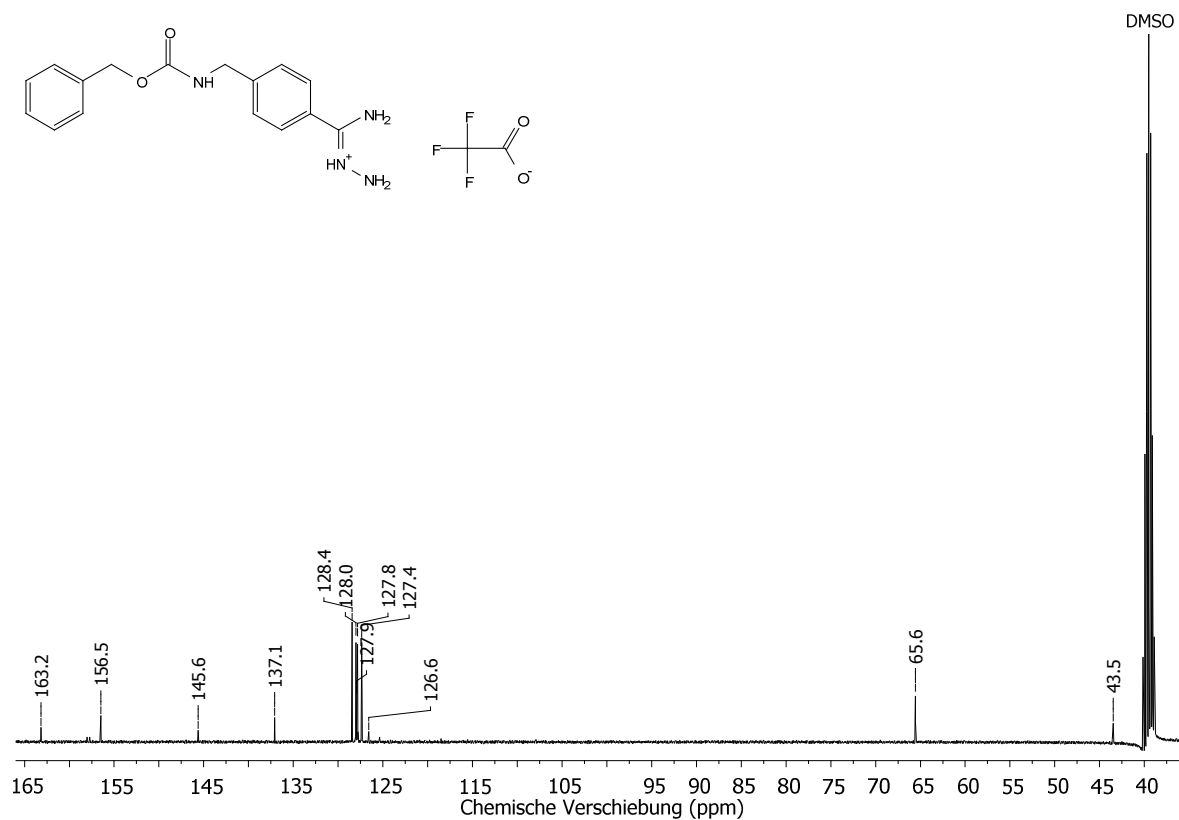


Abbildung 47: ¹³C-Spektrum der Verbindung **79** (101 MHz, DMSO-d₆).

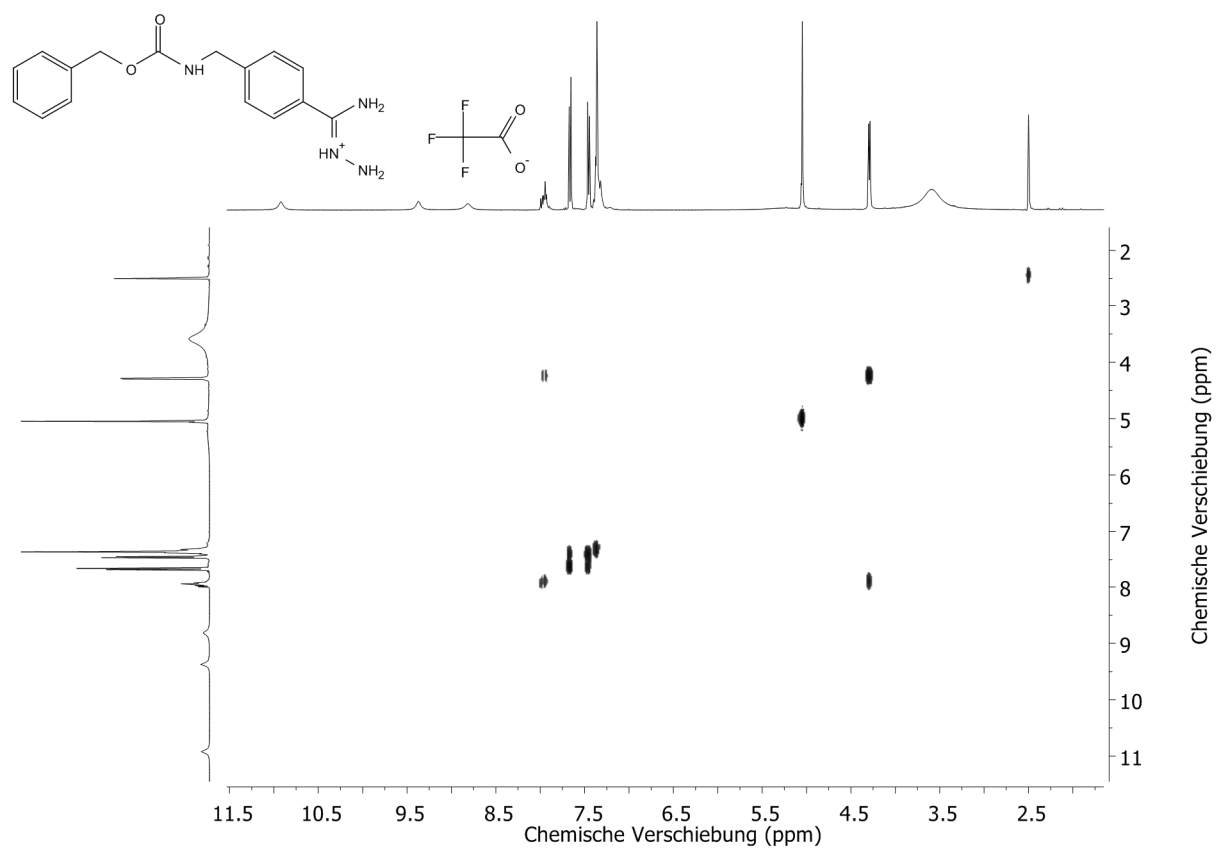


Abbildung 48: H,H-COSY-Spektrum der Verbindung **79** (400 MHz, DMSO-d₆).

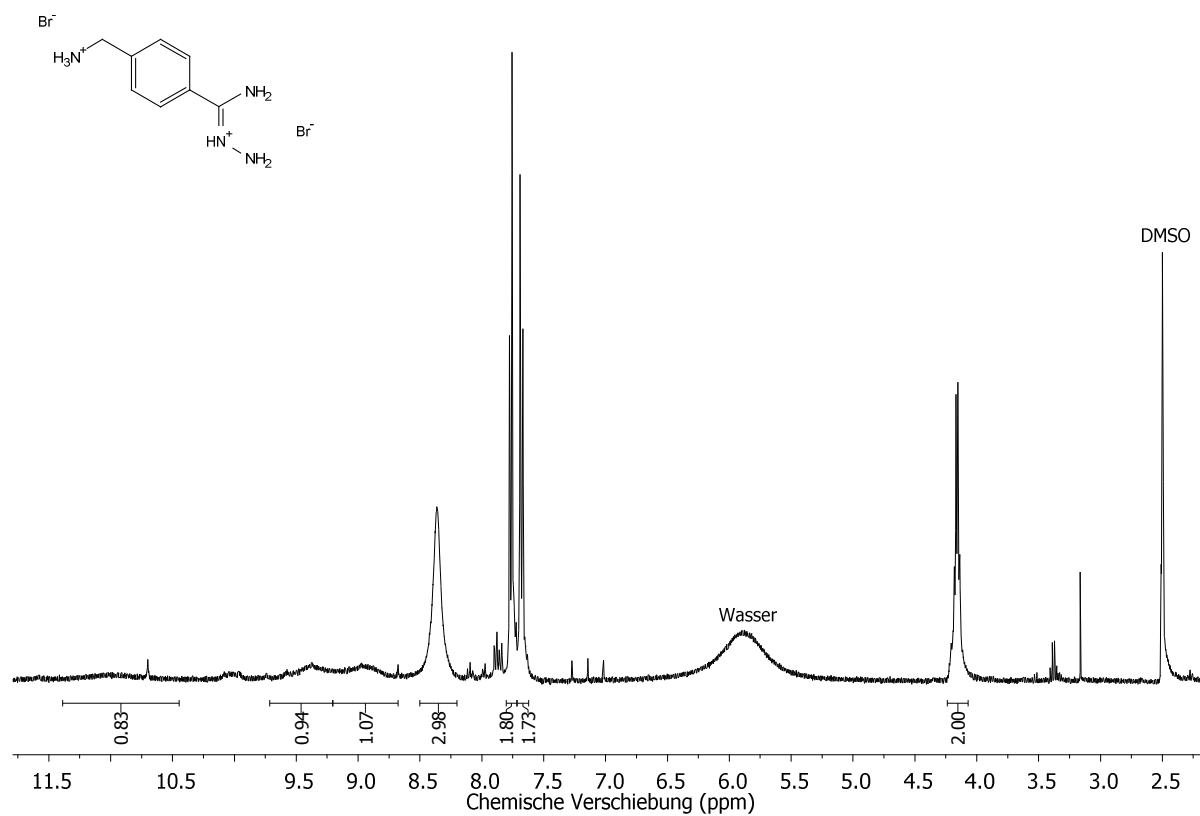


Abbildung 49: ^1H -Spektrum der Verbindung **80** (400 MHz, DMSO-d_6).

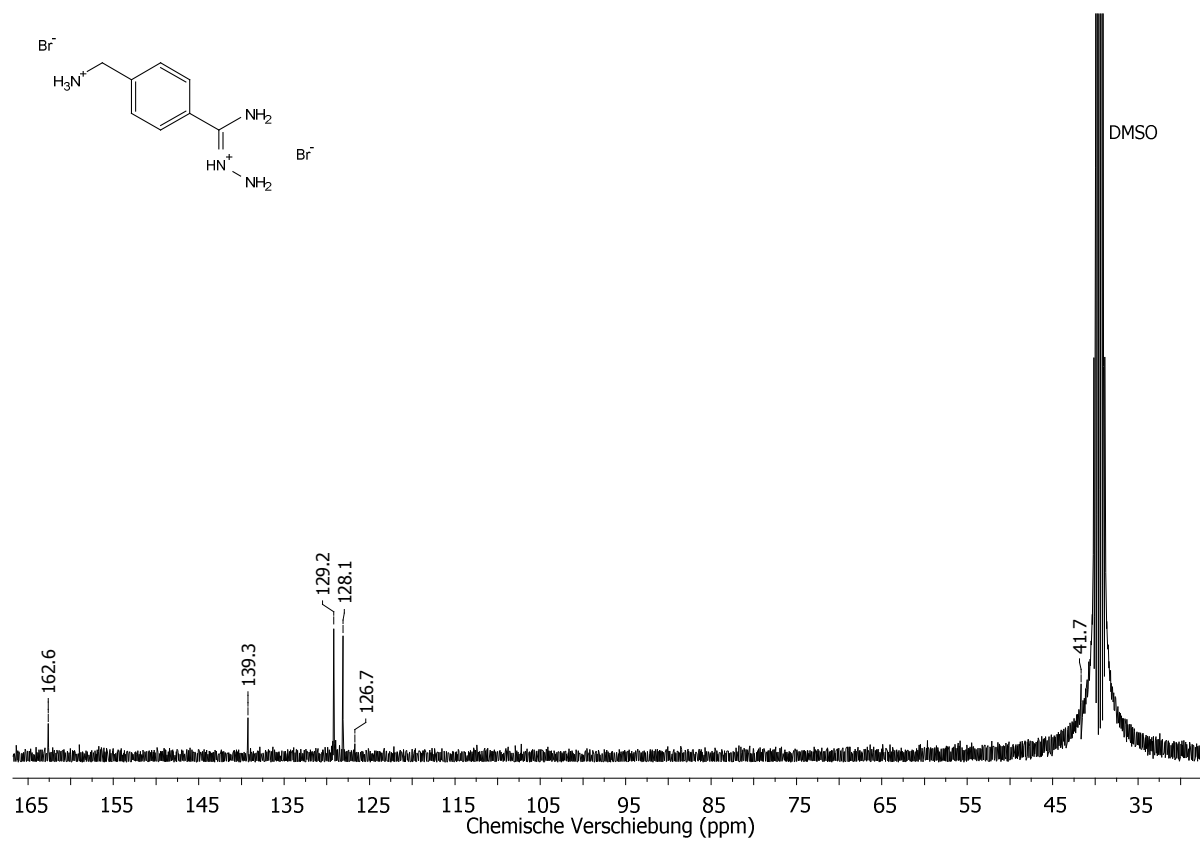


Abbildung 50: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **80** (101 MHz, DMSO-d_6).

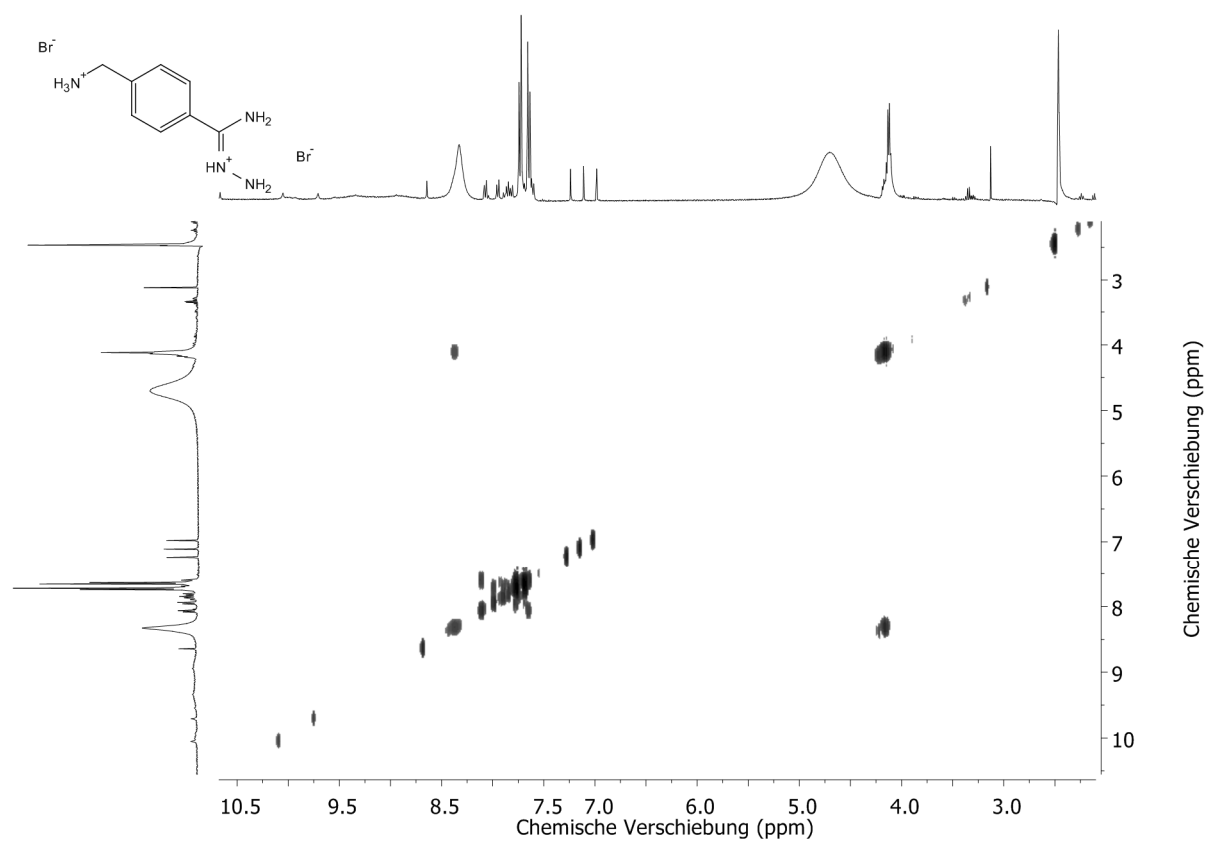


Abbildung 51: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **80** (400 MHz, DMSO-d_6).

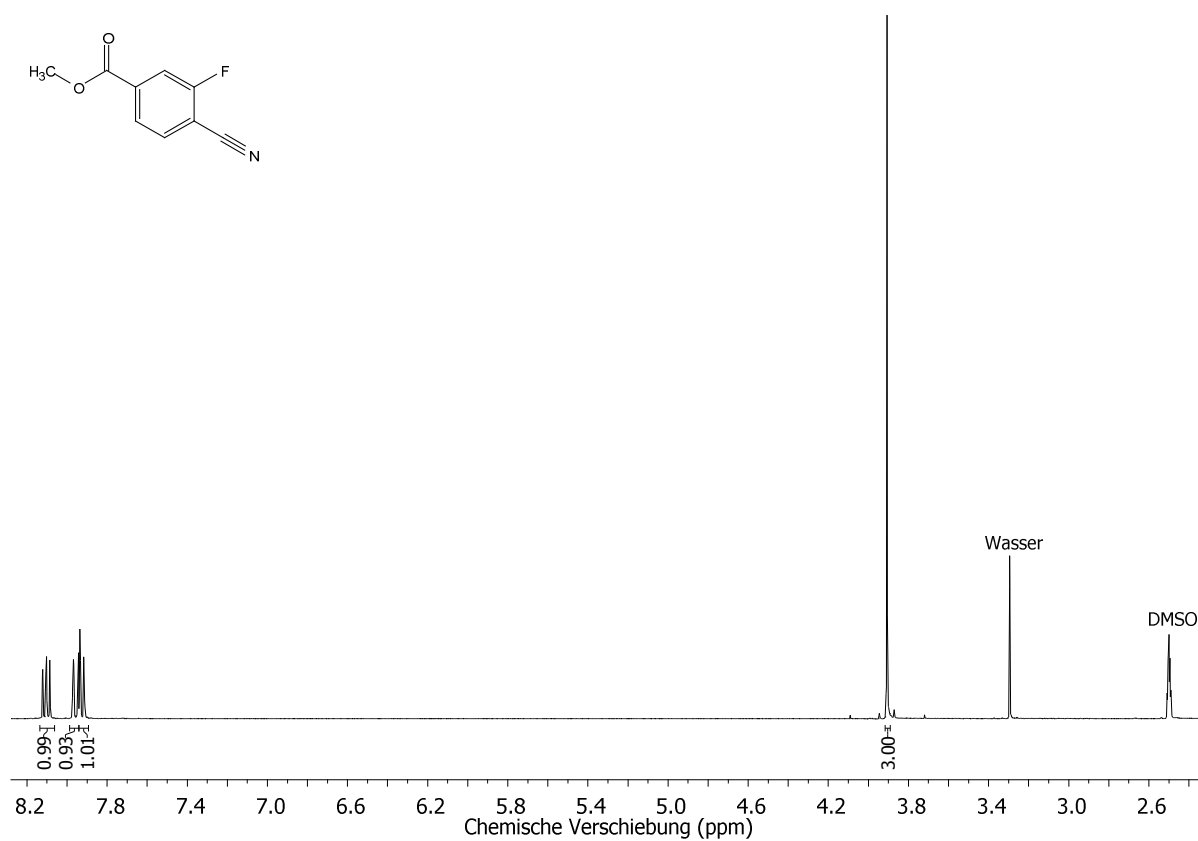


Abbildung 52: ^1H -Spektrum der Verbindung **81** (400 MHz, DMSO-d_6).

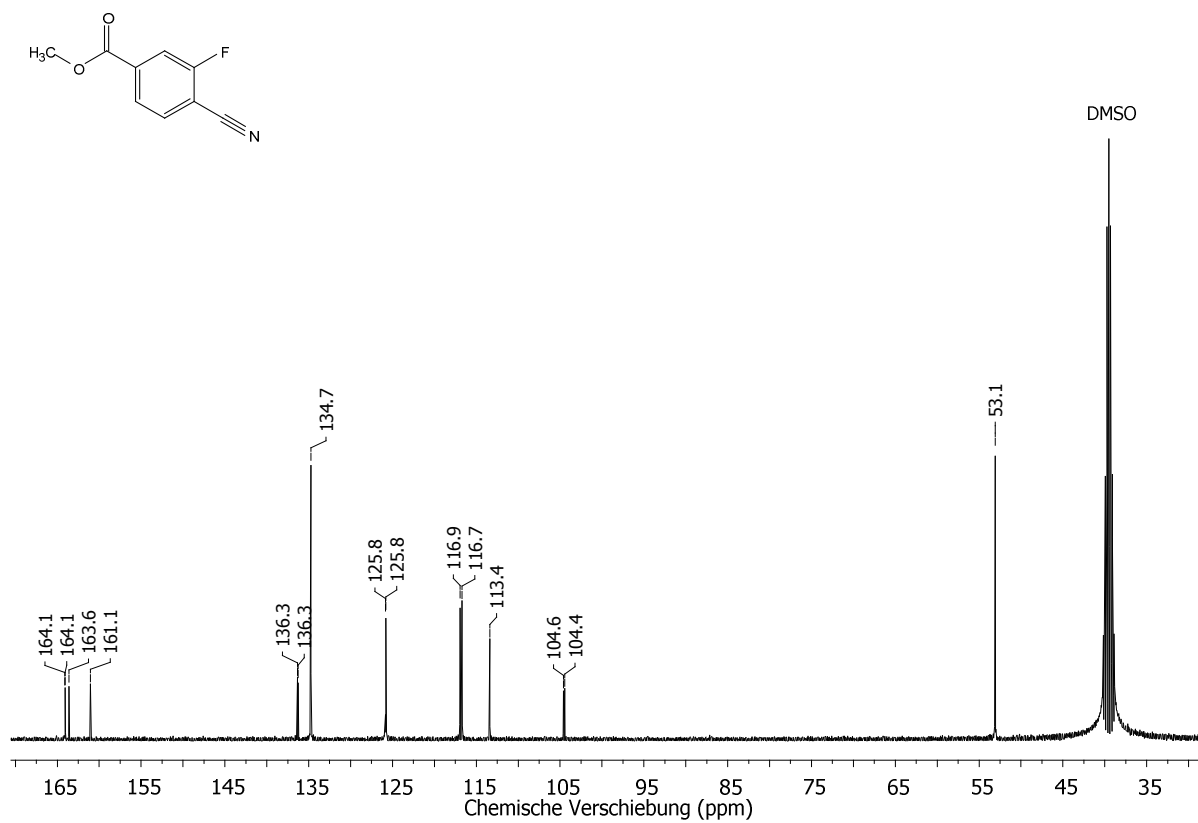


Abbildung 53: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **81** (101 MHz, DMSO-d_6).

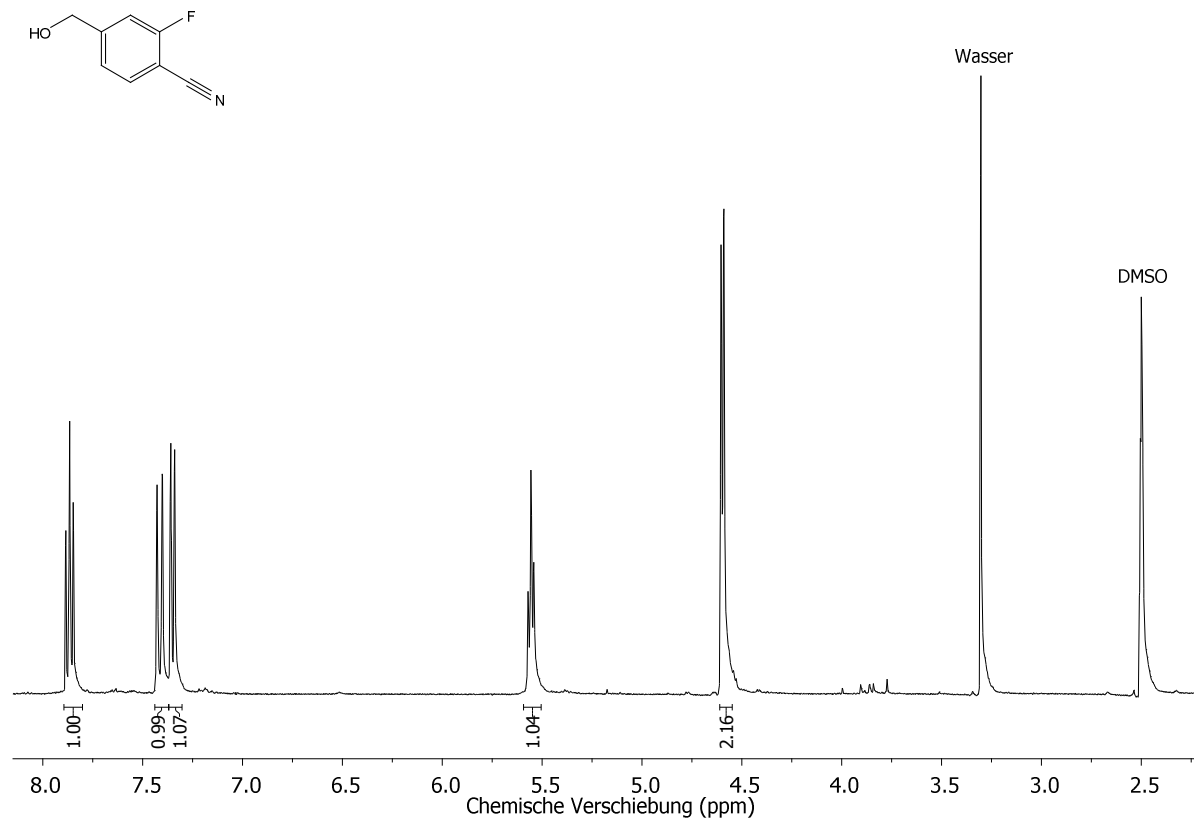


Abbildung 54: ¹H-Spektrum der Verbindung **82** (400 MHz, DMSO-d₆).

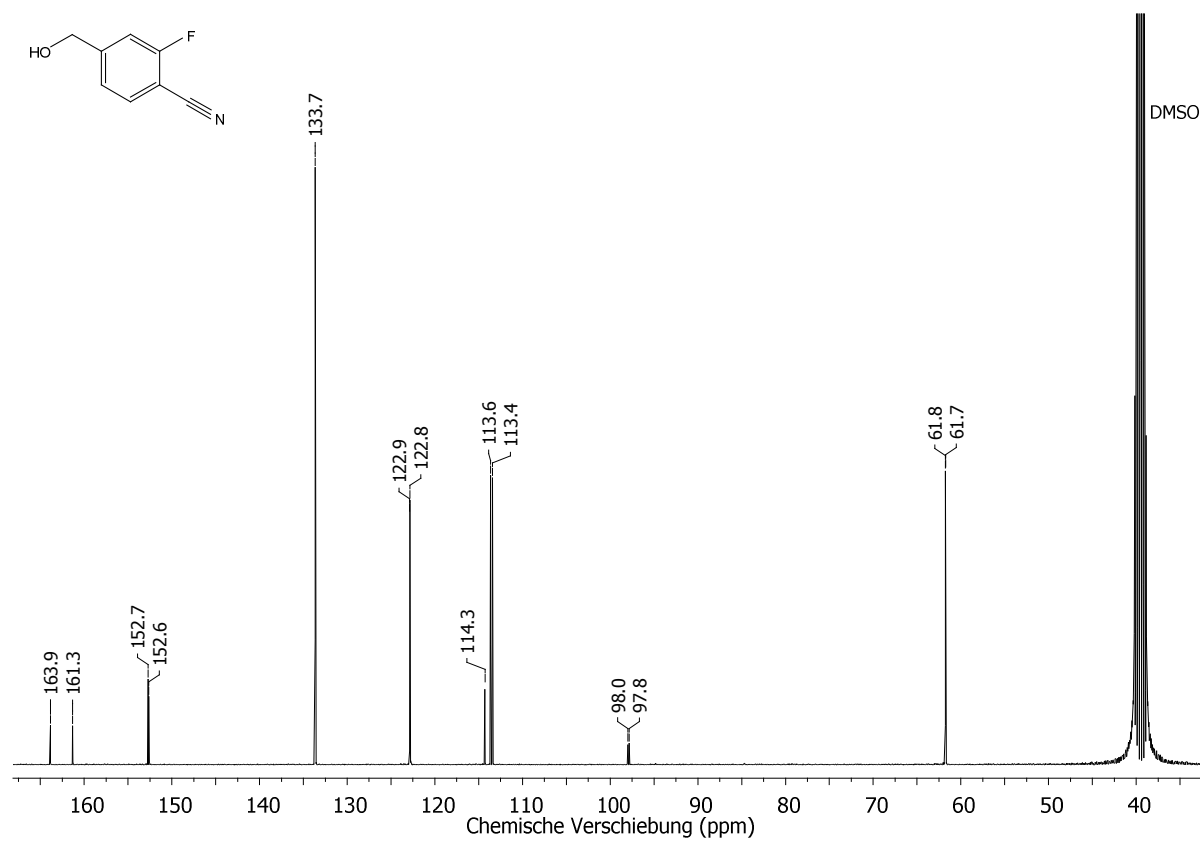


Abbildung 55: ¹³C-Spektrum der Verbindung **82** (101 MHz, DMSO-d₆).

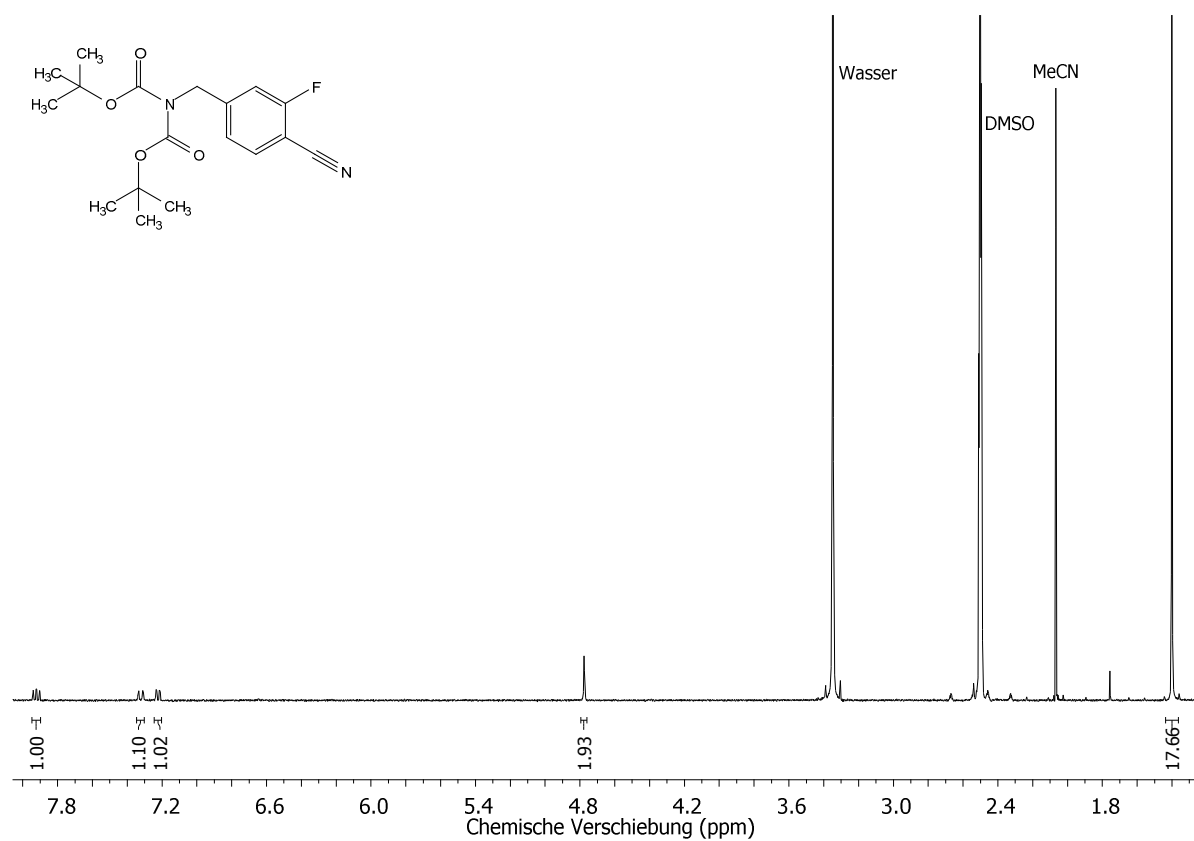


Abbildung 56: ¹H-Spektrum der Verbindung **83** (400 MHz, DMSO-d₆).

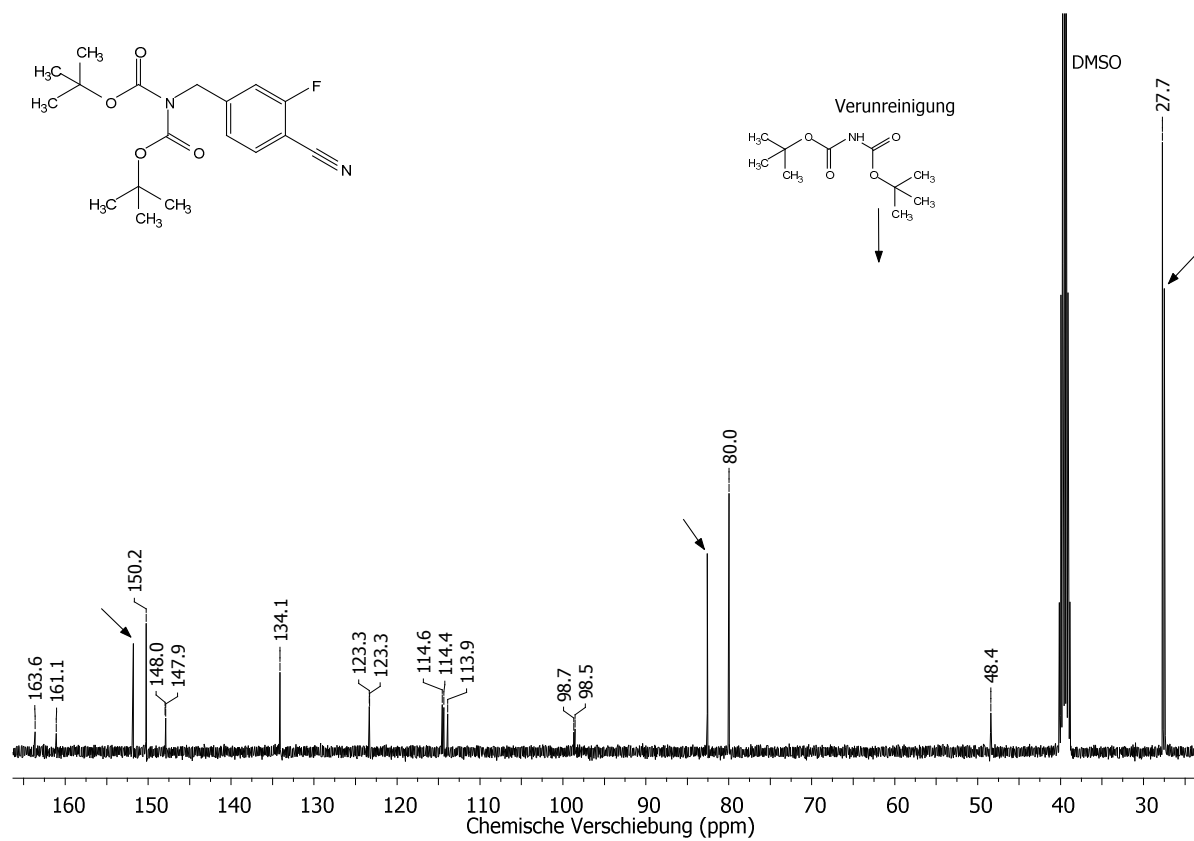


Abbildung 57: ¹³C-Spektrum der Verbindung **83** (101 MHz, DMSO-d₆).

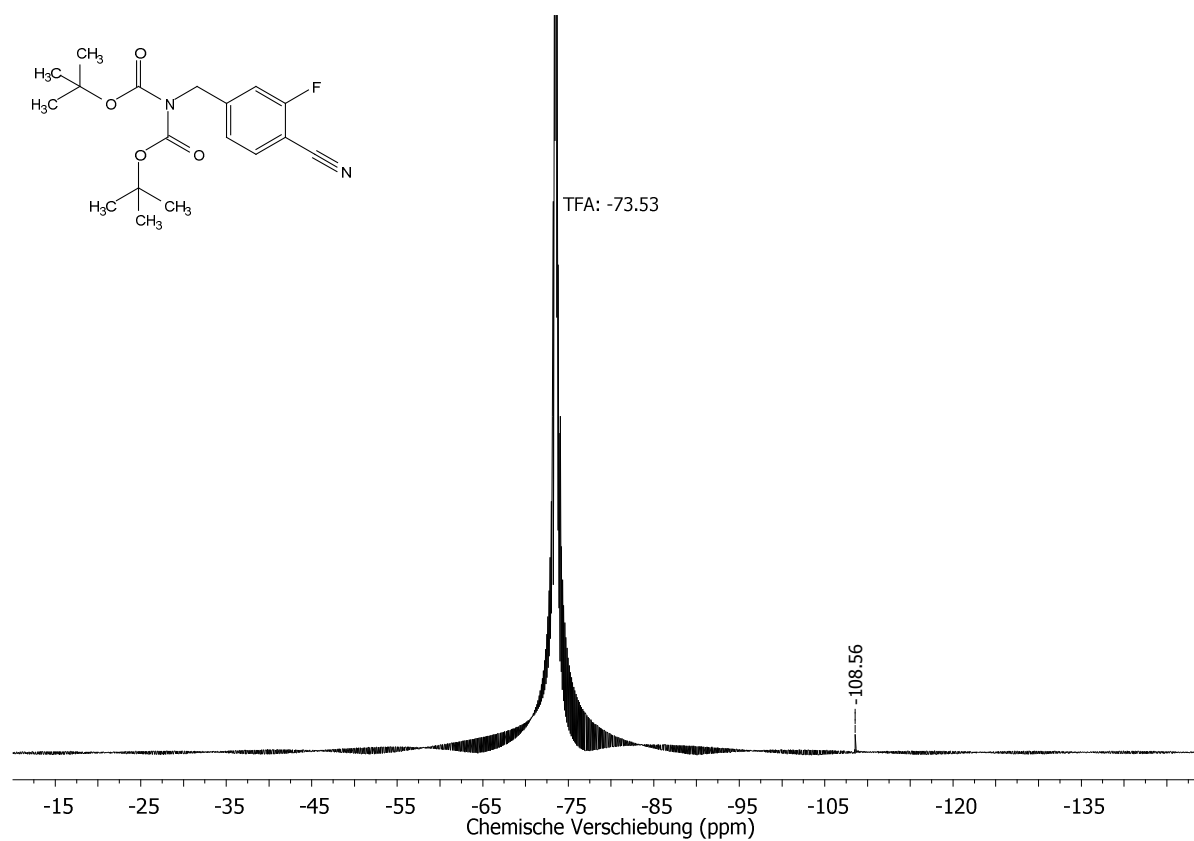


Abbildung 58: ¹⁹F-Spektrum der Verbindung **83** (376 MHz, DMSO-d₆).

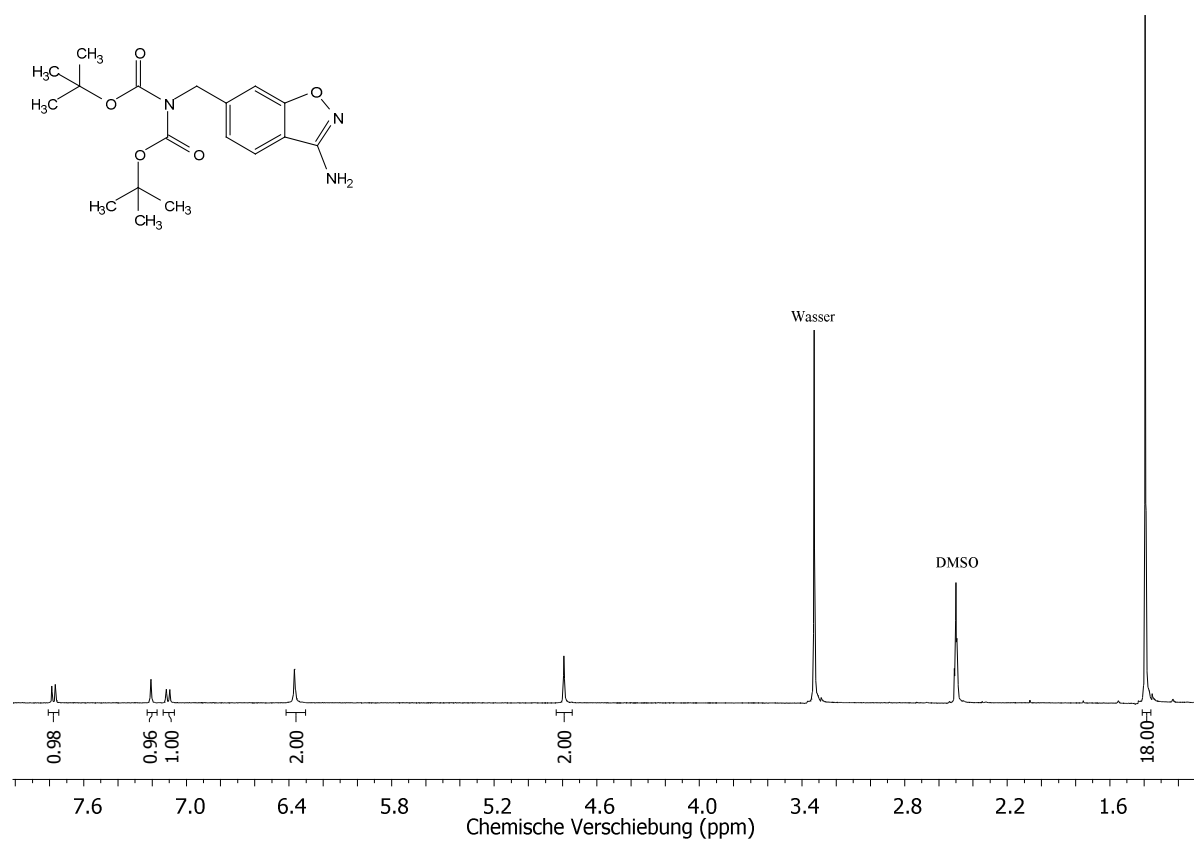


Abbildung 59: ¹H-Spektrum der Verbindung **84** (400 MHz, DMSO-d₆).

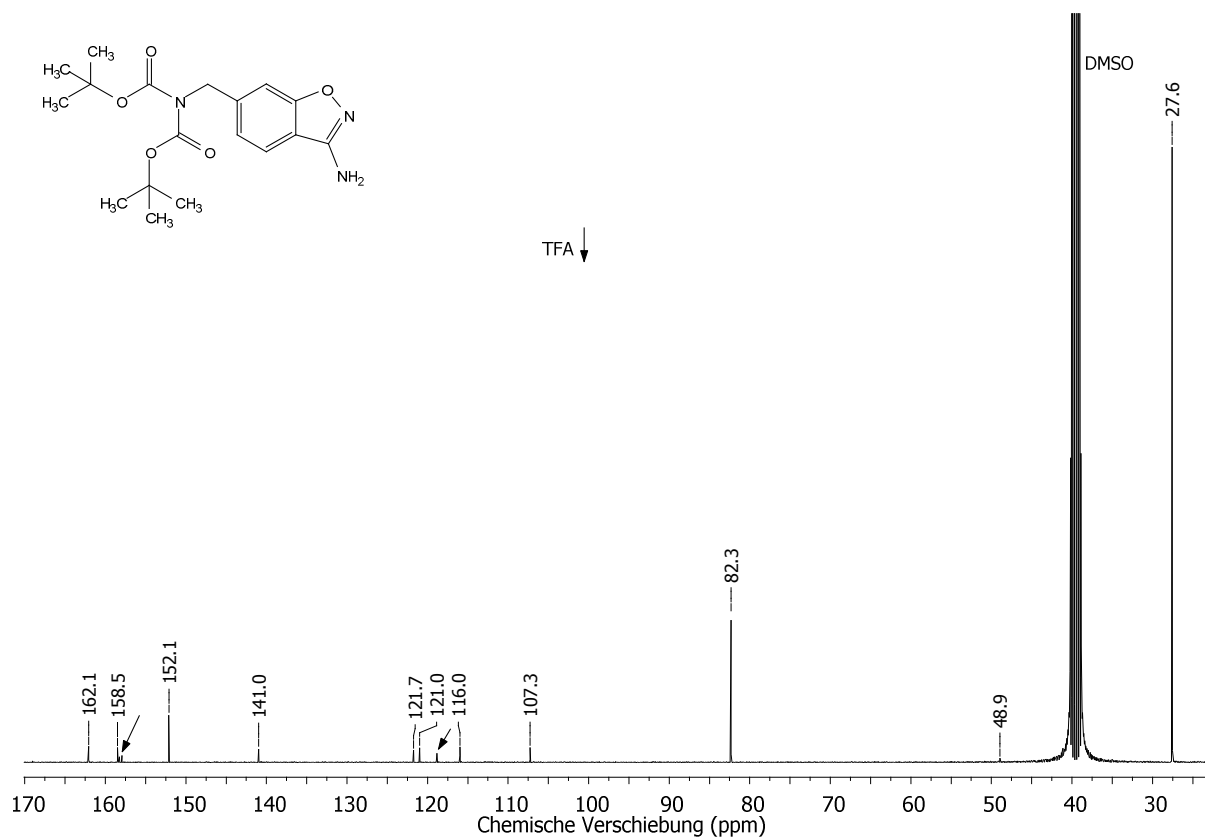


Abbildung 60: ¹³C-Spektrum der Verbindung **84** (101 MHz, DMSO-d₆).

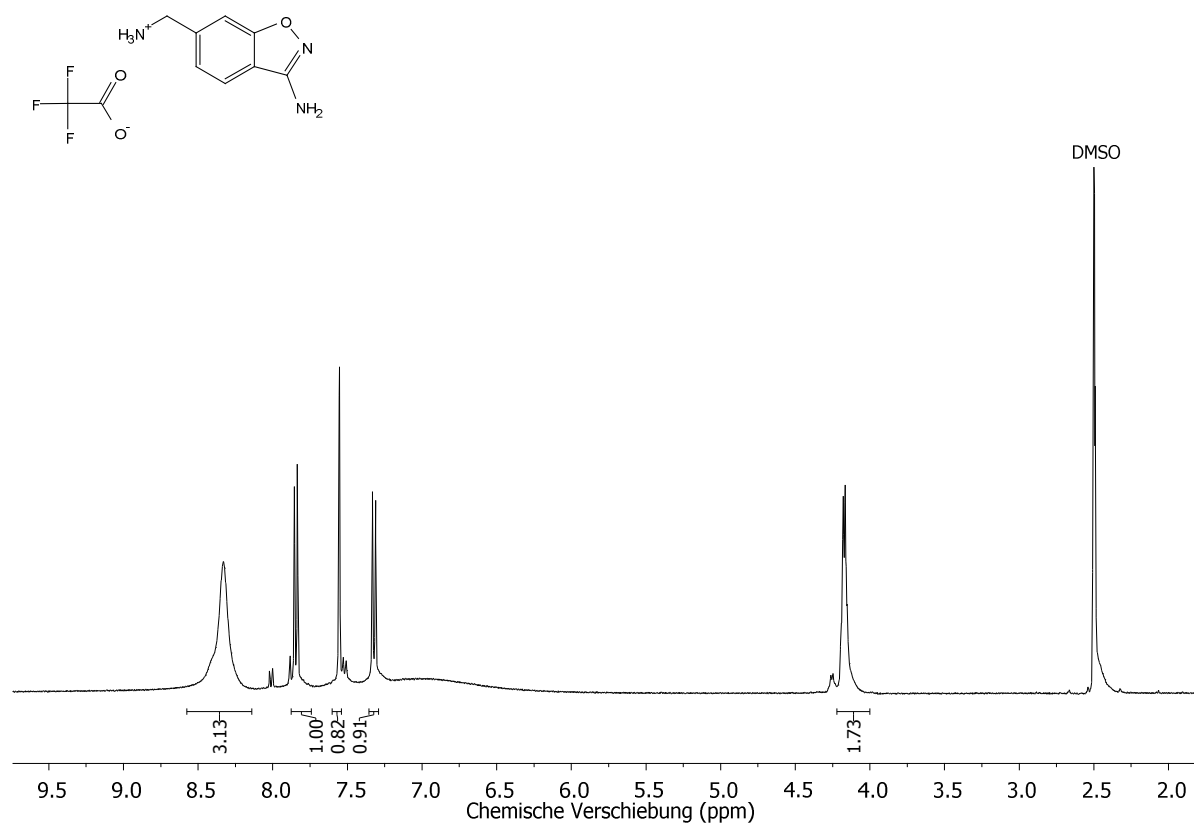


Abbildung 61: ¹H-Spektrum der Verbindung **85** (400 MHz, DMSO-d₆).

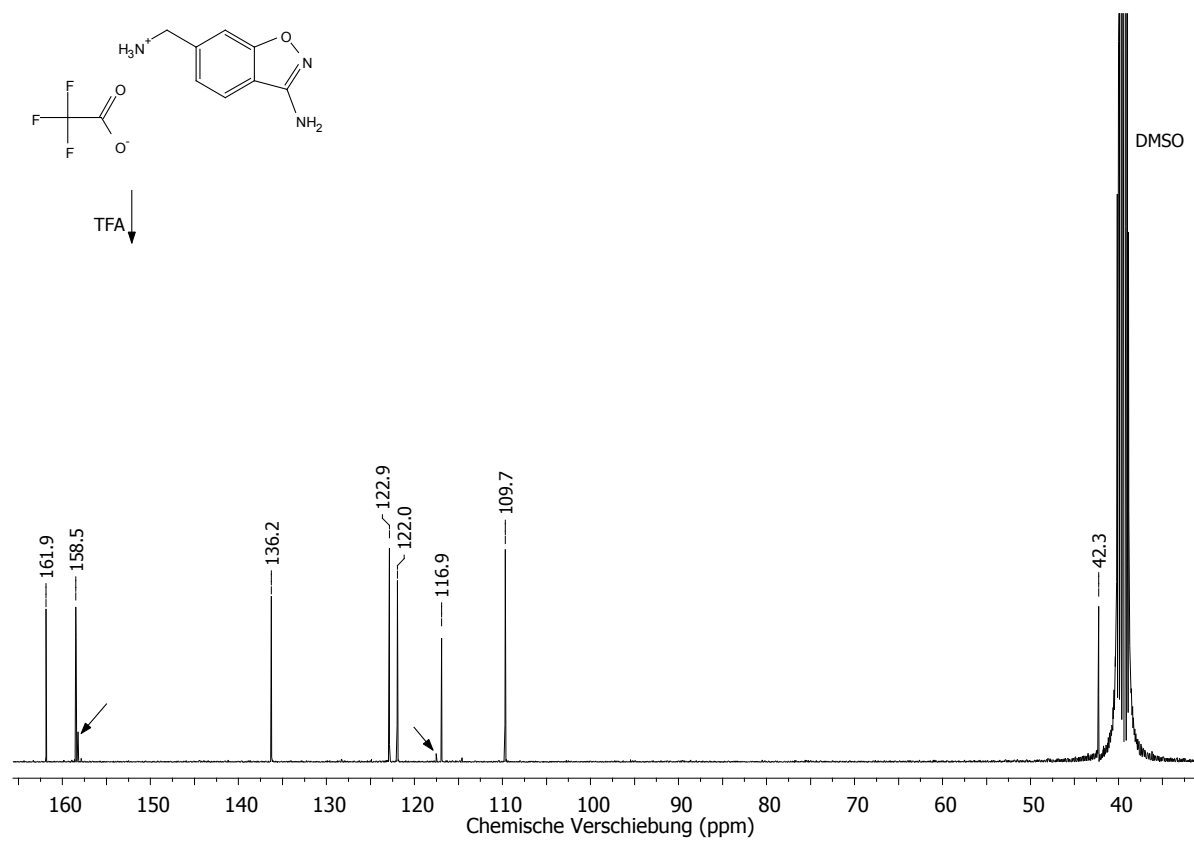


Abbildung 62: ¹³C-Spektrum der Verbindung **85** (101 MHz, DMSO-d₆).

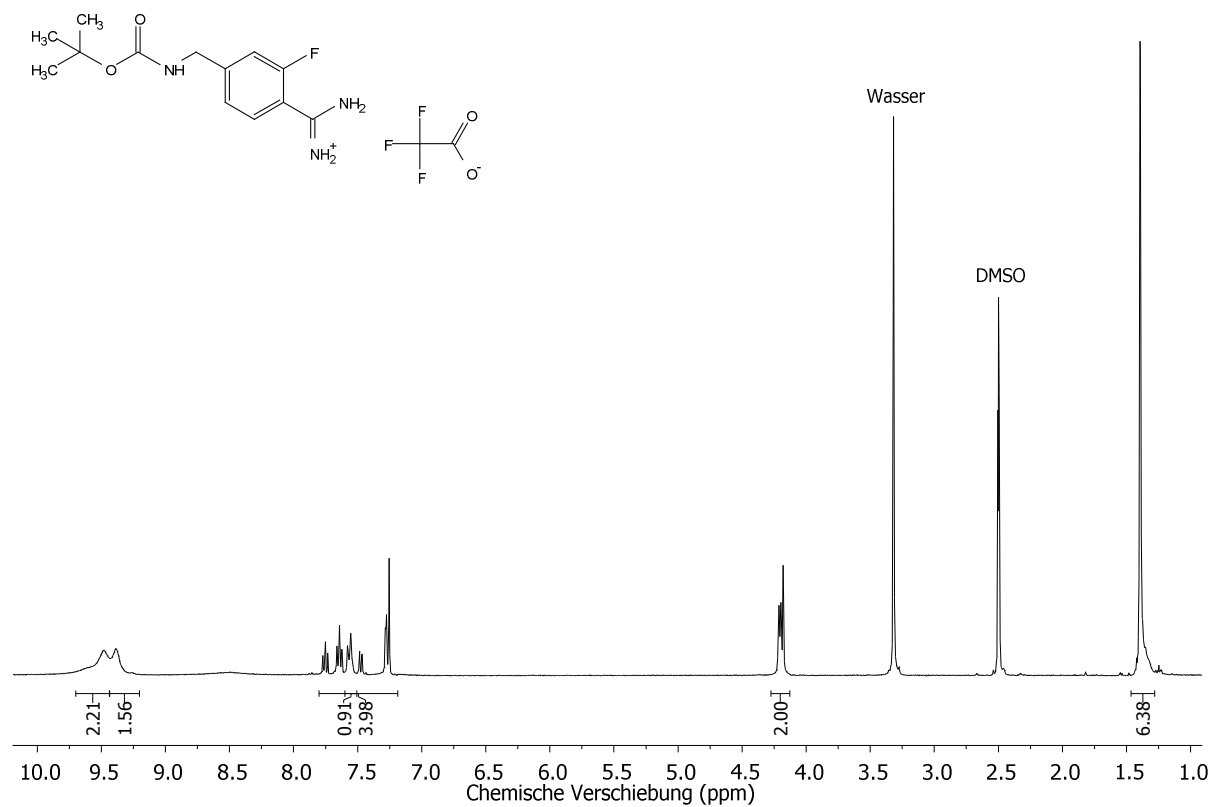


Abbildung 63: ^1H -Spektrum der Verbindung **86** (400 MHz, DMSO-d_6).

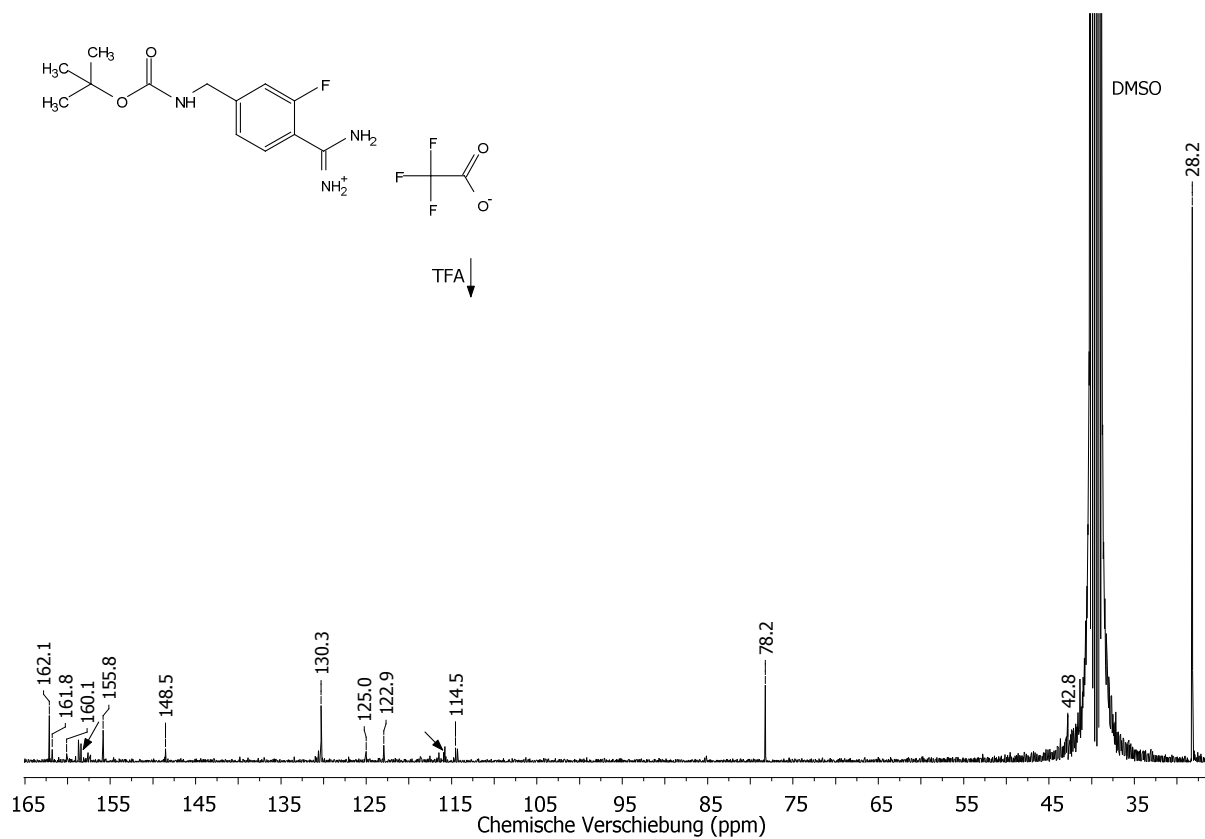


Abbildung 64: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **86** (101 MHz, DMSO-d_6).

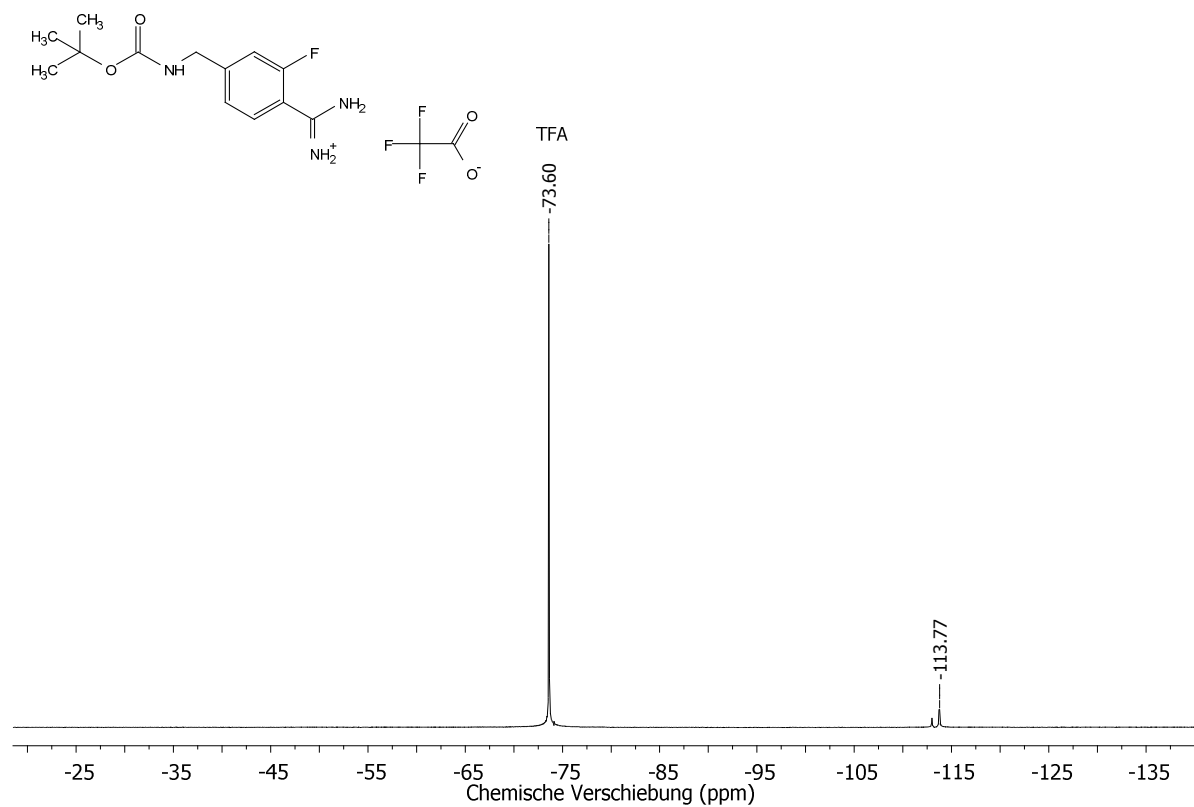


Abbildung 65: ^{19}F -Spektrum der Verbindung **86** (376 MHz, DMSO-d_6).

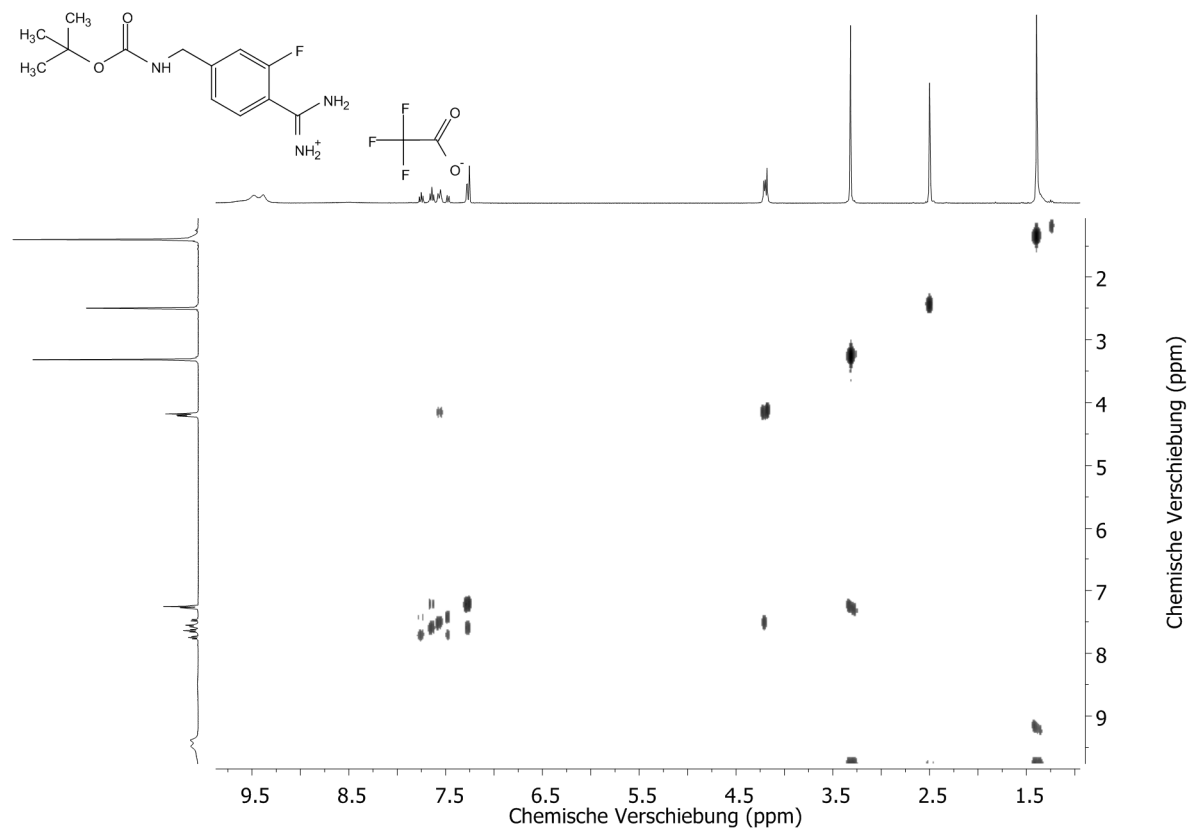


Abbildung 66: H,H-COSY -Spektrum der Verbindung **86** (400 MHz, DMSO-d_6).

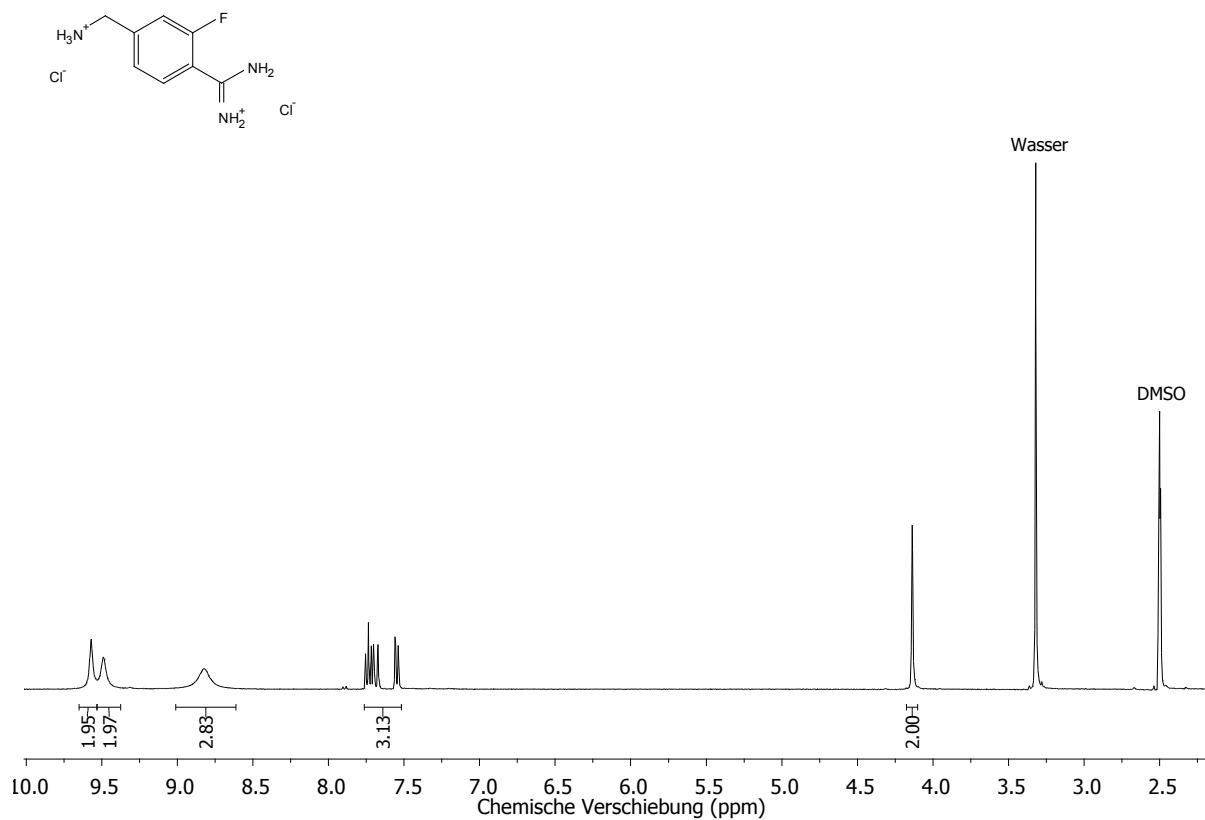


Abbildung 67: ¹H-Spektrum der Verbindung **87** (400 MHz, DMSO-d₆).

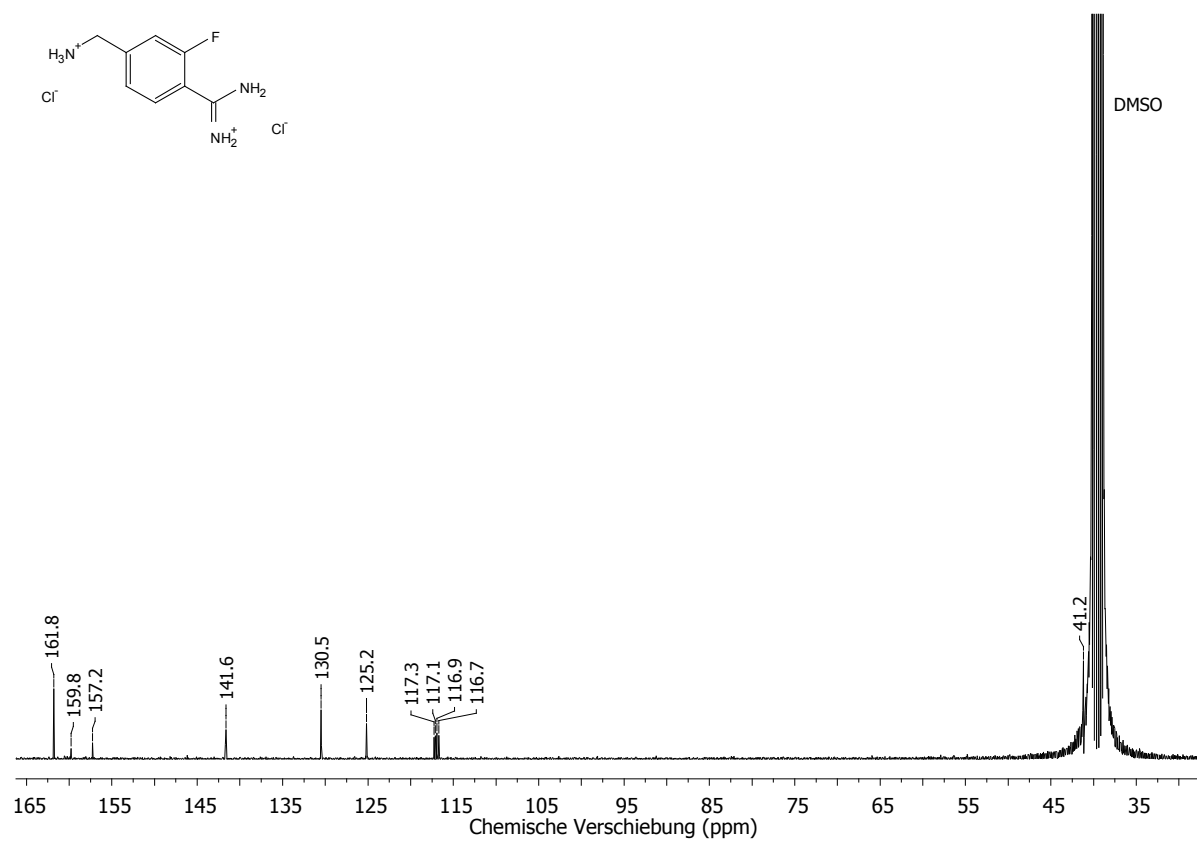


Abbildung 68: ¹³C-Spektrum der Verbindung **87** (101 MHz, DMSO-d₆).

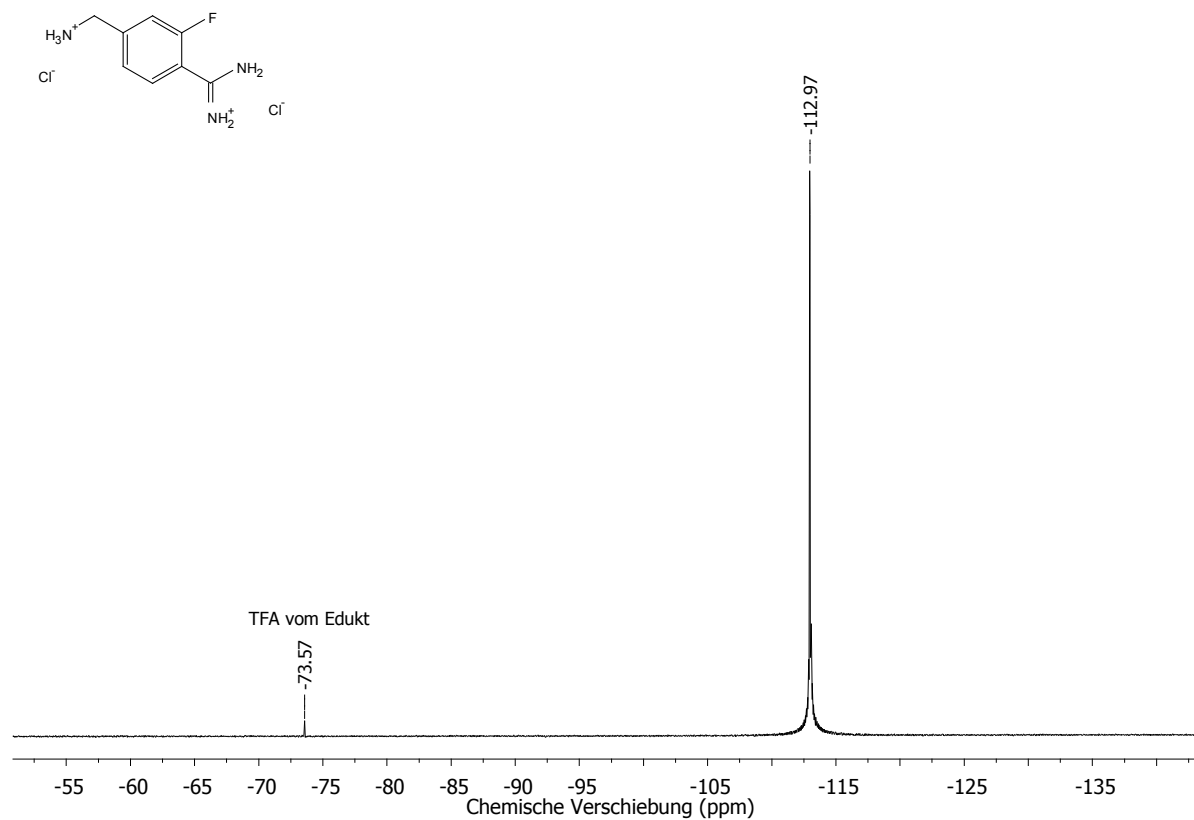


Abbildung 69: ¹⁹F-Spektrum der Verbindung **87** (376 MHz, DMSO-d₆).

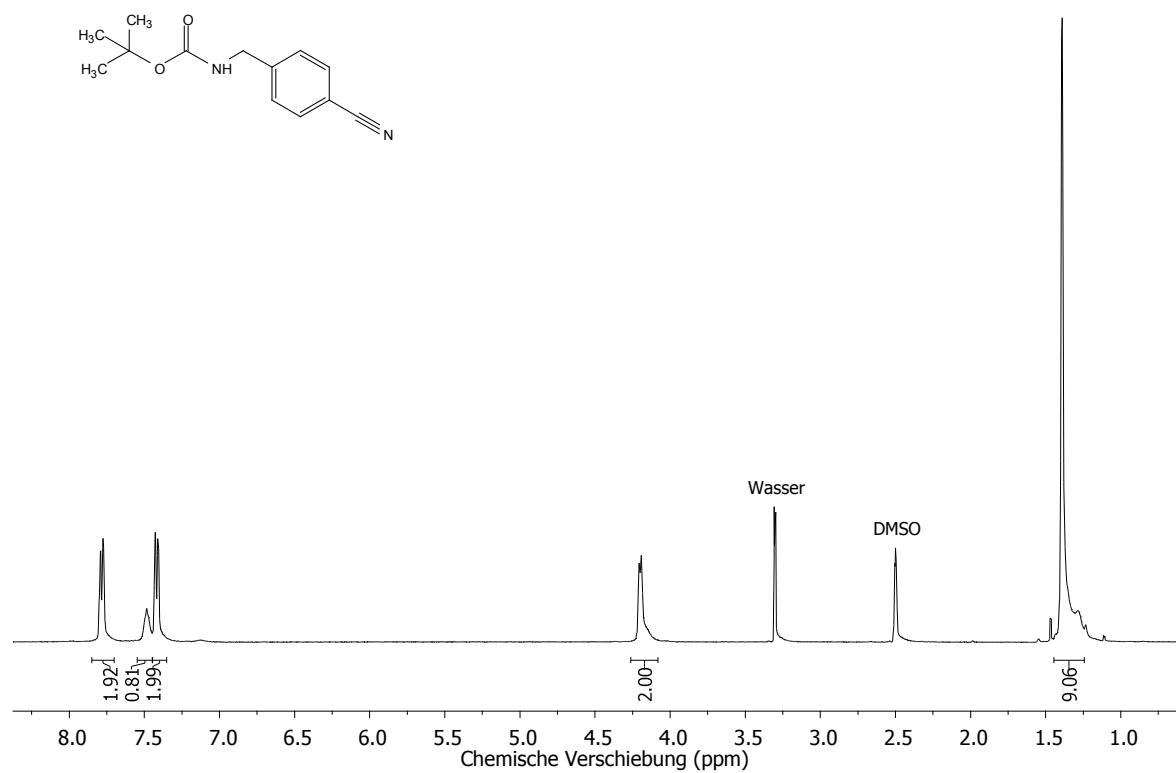


Abbildung 70: ¹H-Spektrum der Verbindung **88** (400 MHz, DMSO-d₆).

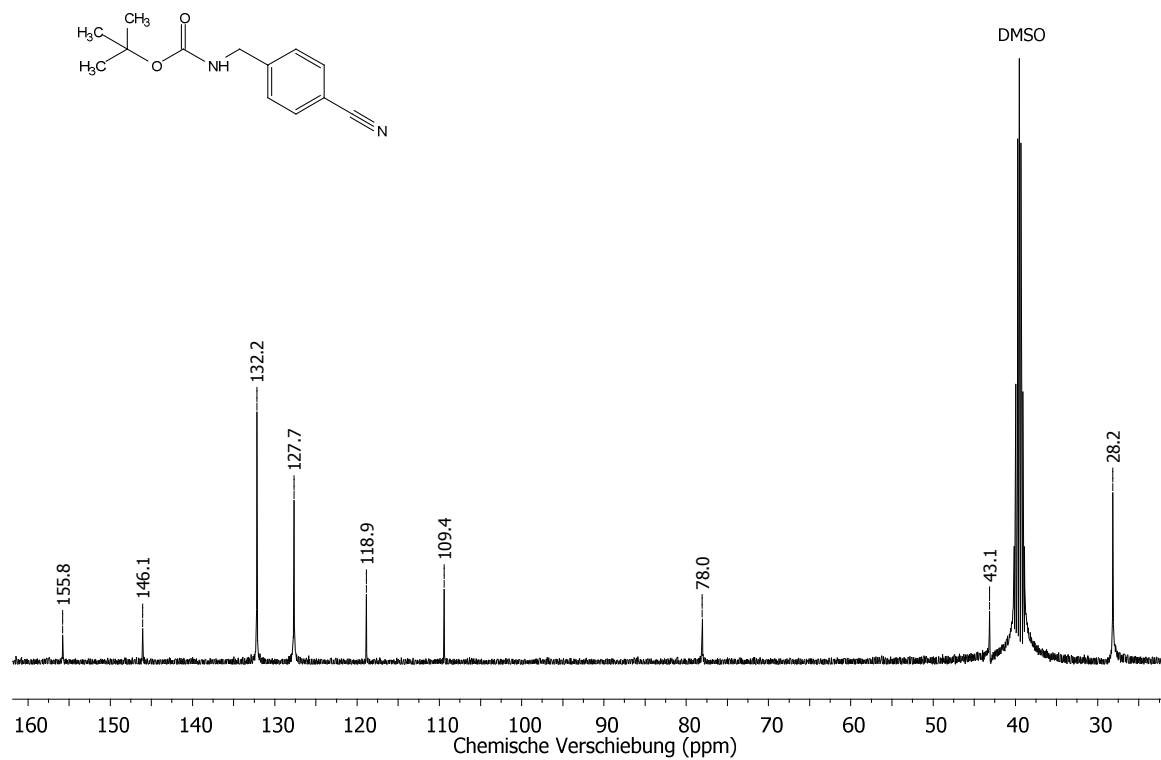


Abbildung 71: ¹³C-Spektrum der Verbindung **88** (101 MHz, DMSO-d₆).

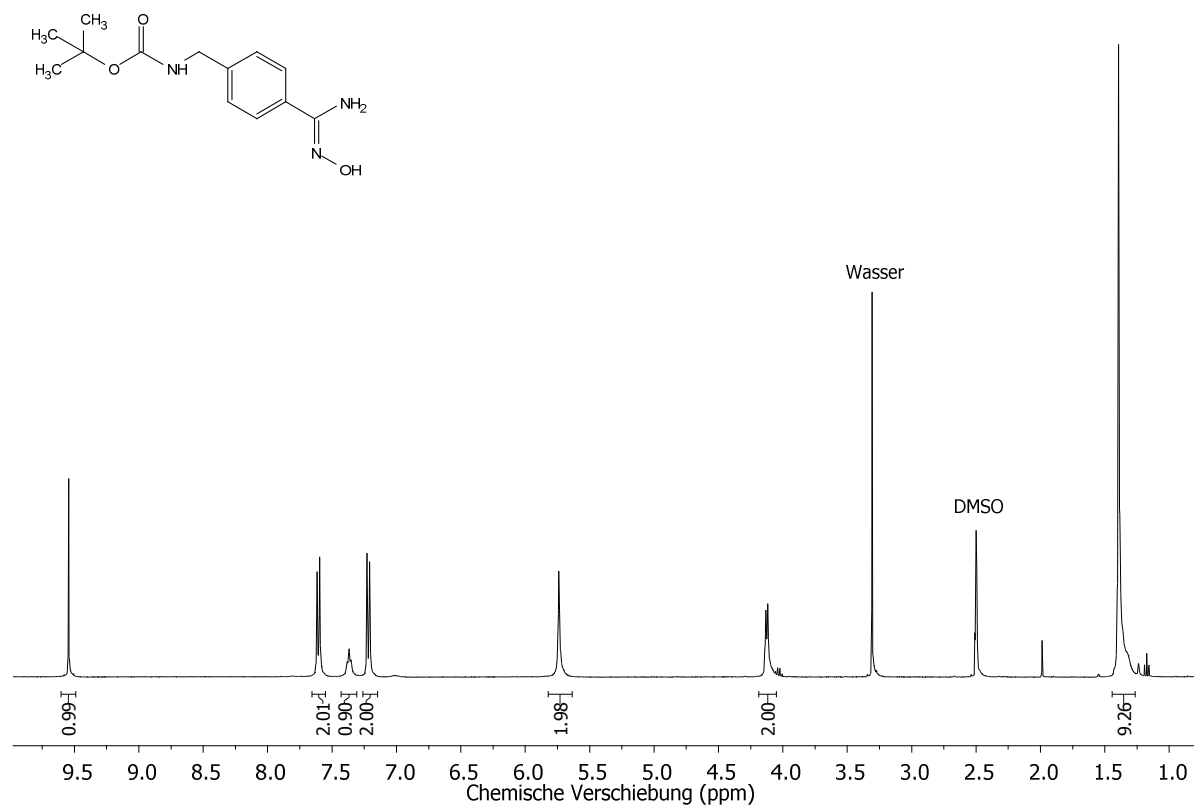


Abbildung 72: ¹H-Spektrum der Verbindung **89** (400 MHz, DMSO-d₆).

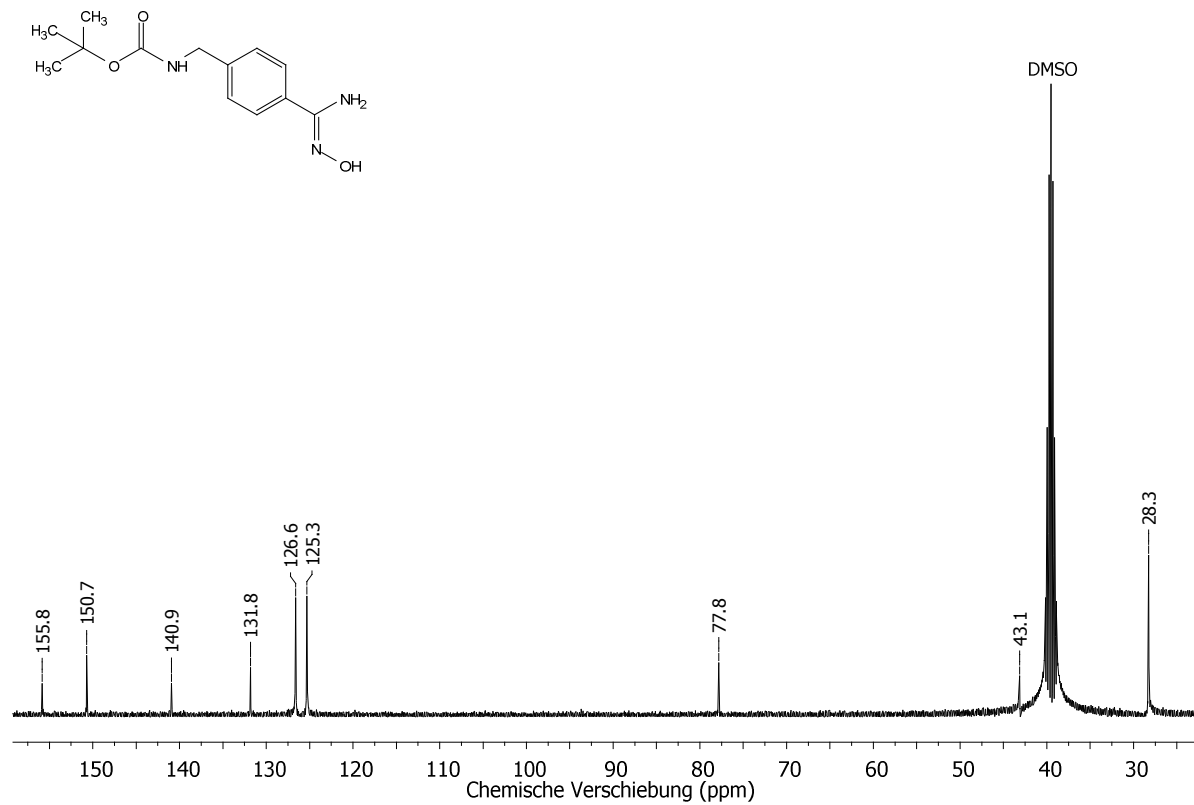


Abbildung 73: ¹³C-Spektrum der Verbindung **89** (101 MHz, DMSO-d₆).

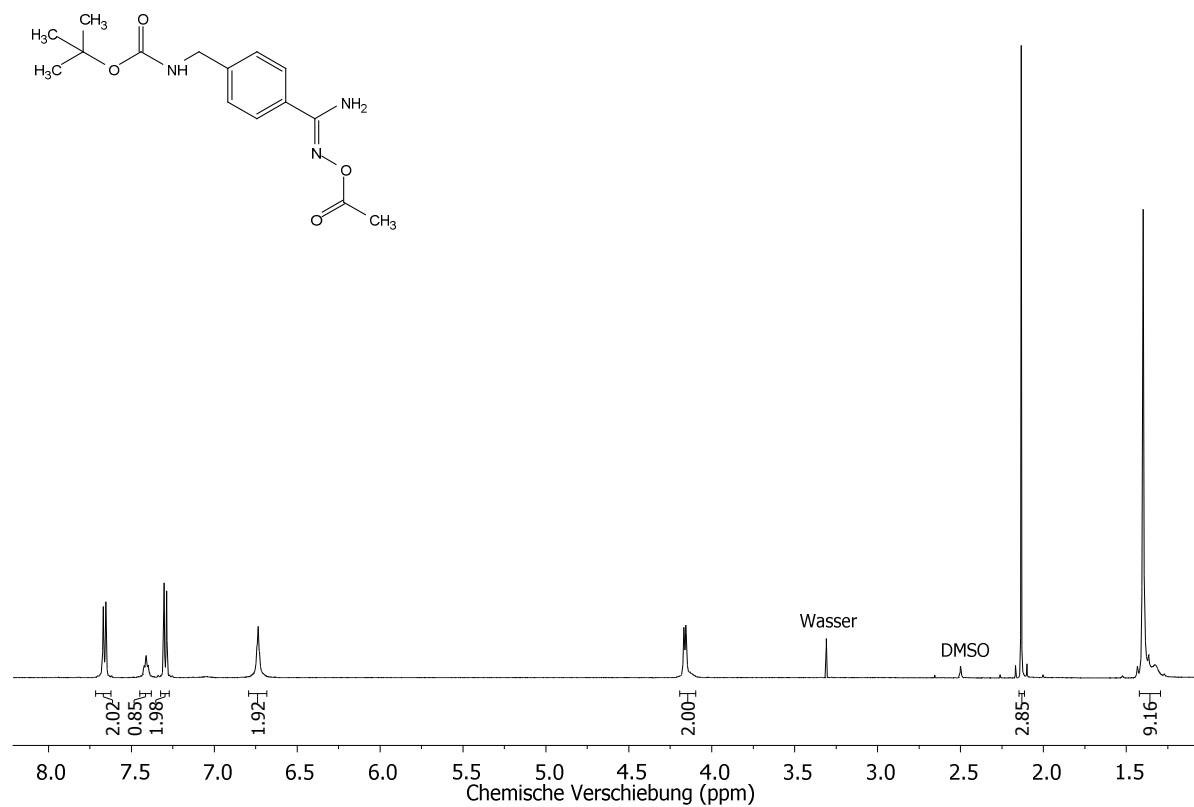


Abbildung 74: ¹H-Spektrum der Verbindung **90** (500 MHz, DMSO-d₆).

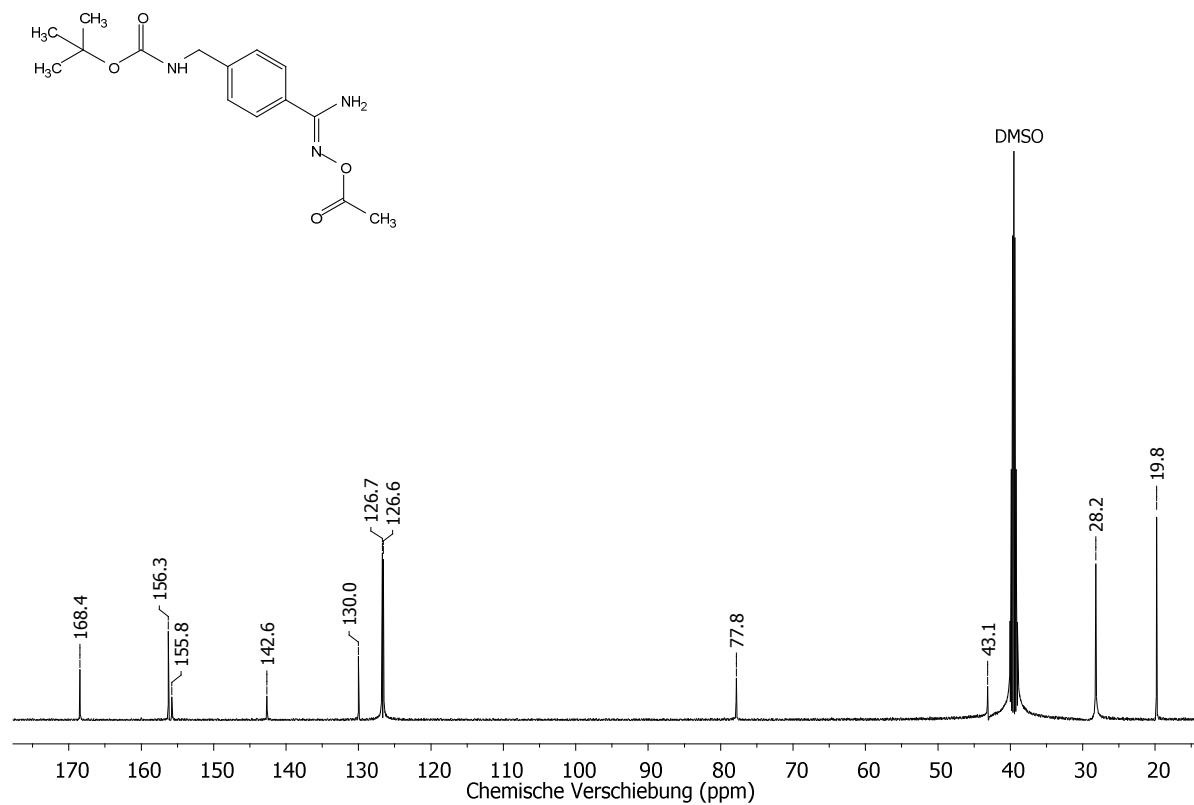


Abbildung 75: ¹³C-Spektrum der Verbindung **90** (126 MHz, DMSO-d₆).

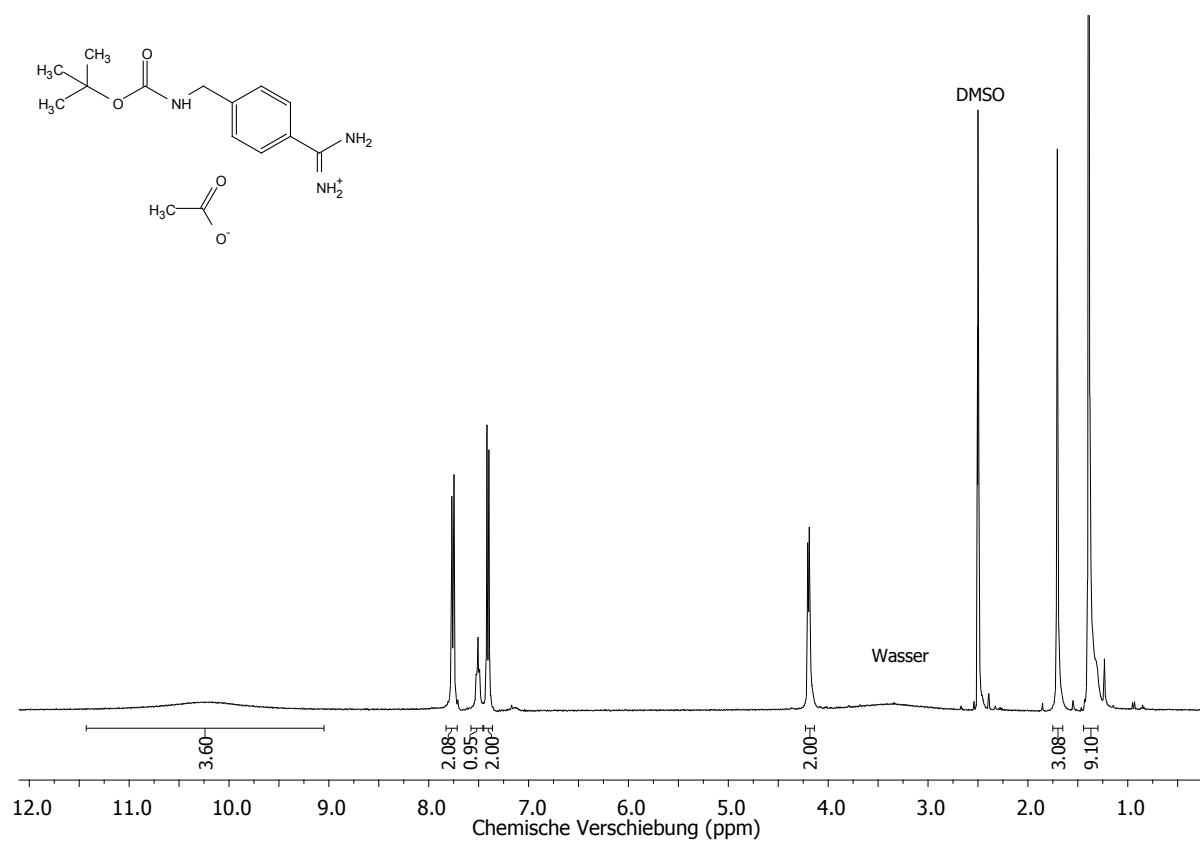


Abbildung 76: ¹H-Spektrum der Verbindung **91** (400 MHz, DMSO-d₆).

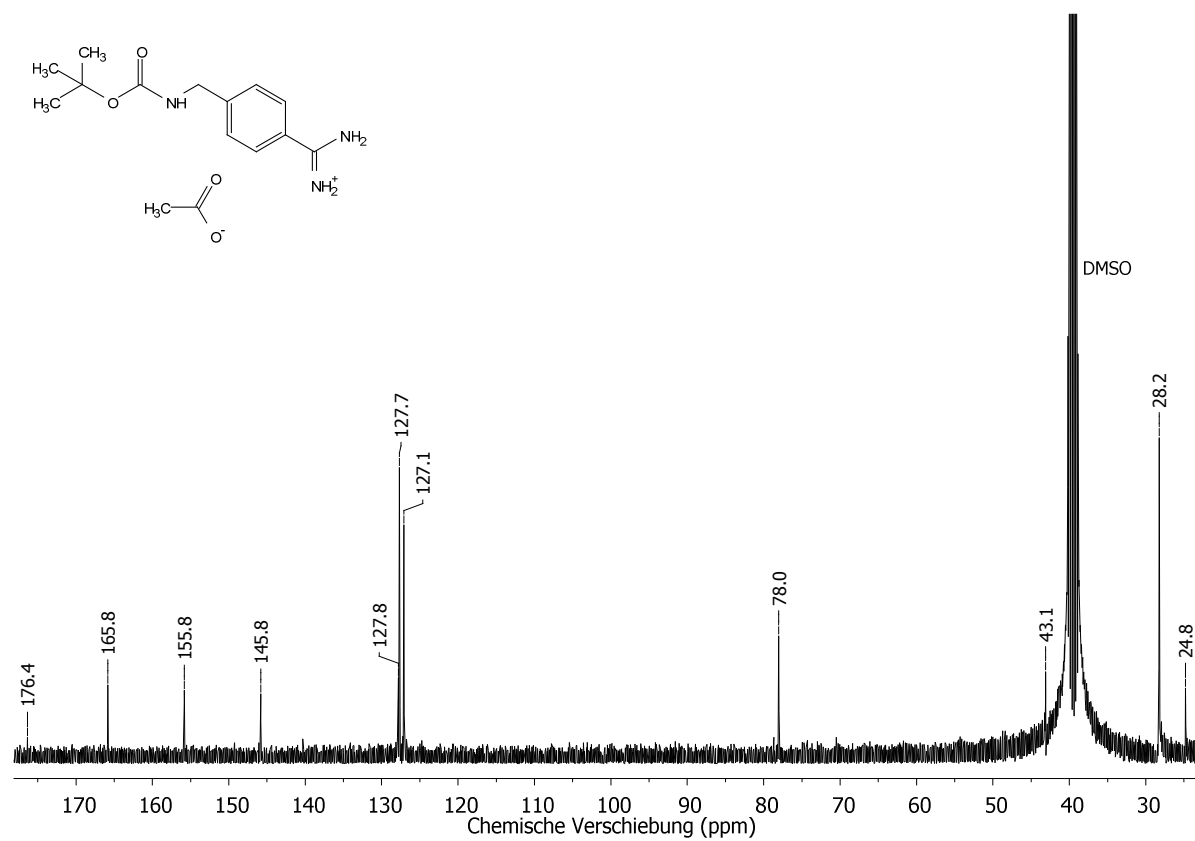


Abbildung 77: ¹³C-Spektrum der Verbindung **91** (101 MHz, DMSO-d₆).

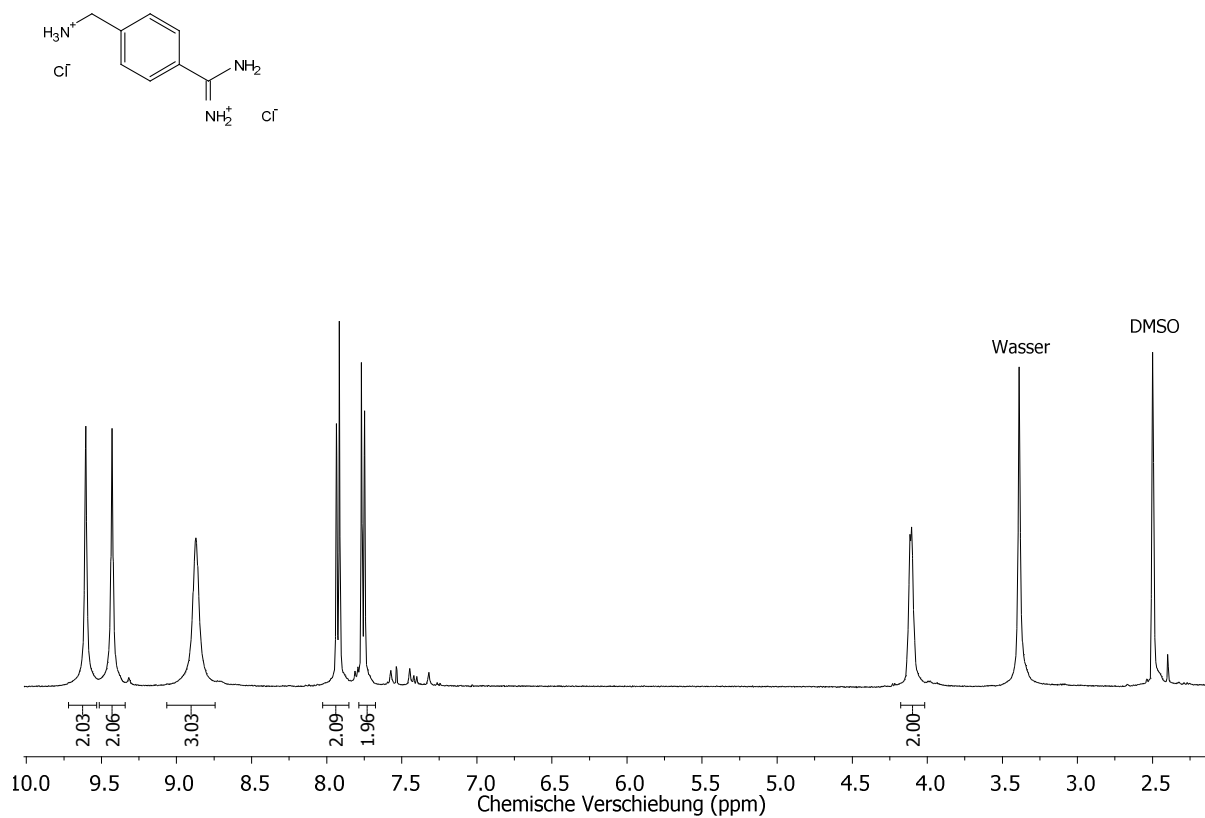


Abbildung 78: ^1H -Spektrum der Verbindung **92** (400 MHz, DMSO-d_6).

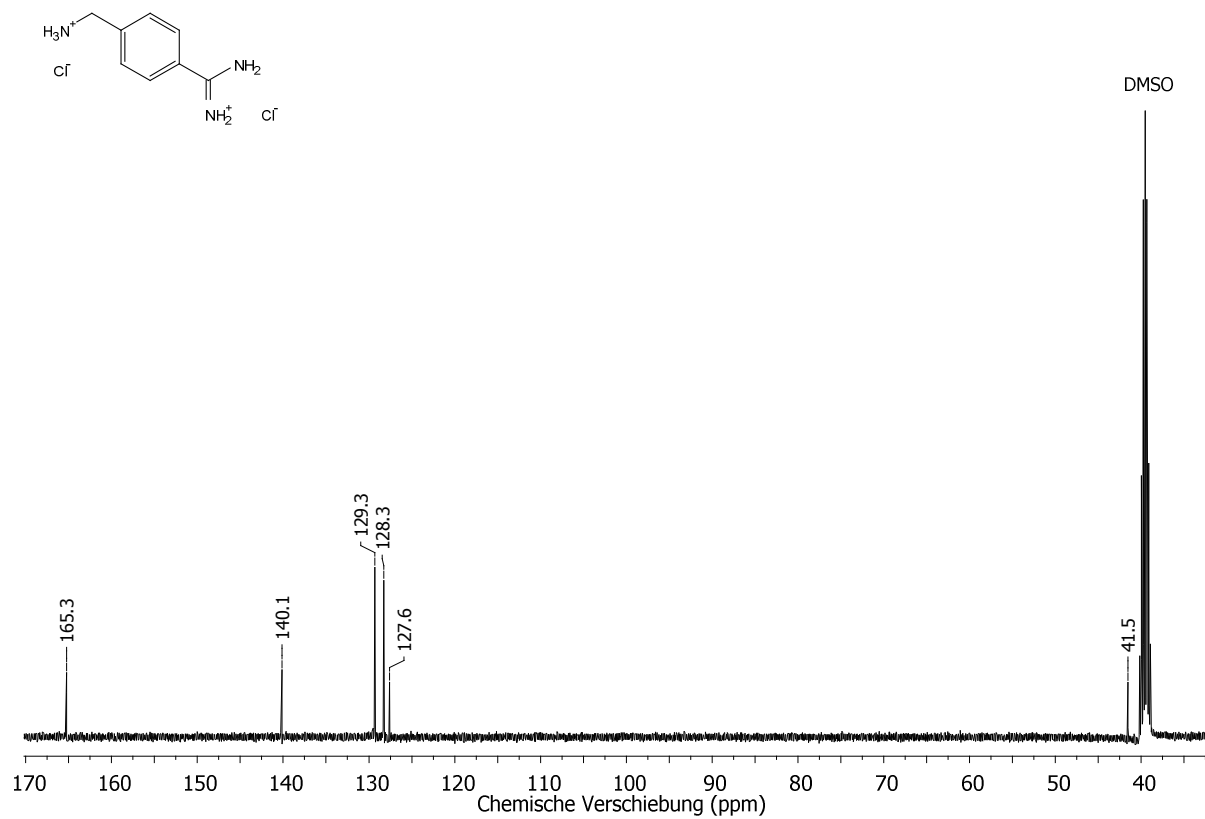


Abbildung 79: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **92** (101 MHz, DMSO-d_6).

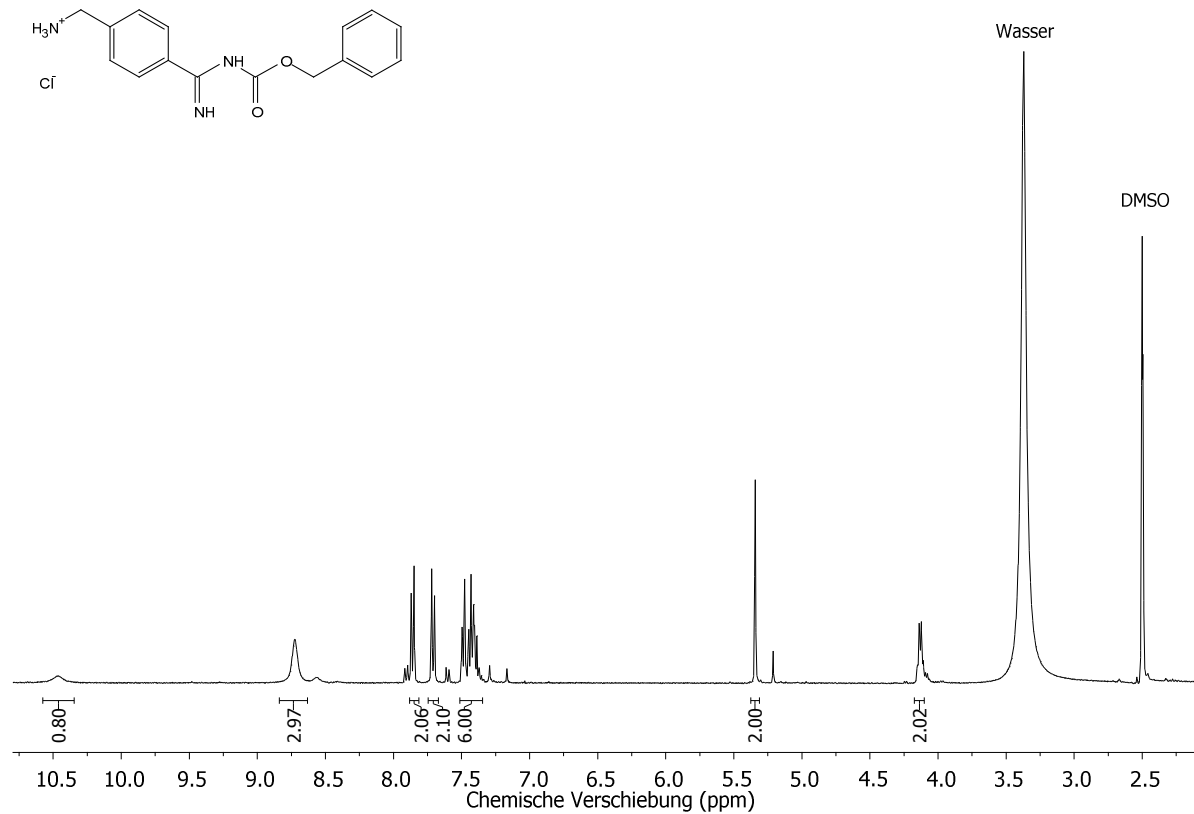


Abbildung 80: ^1H -Spektrum der Verbindung **93** (400 MHz, DMSO-d_6).

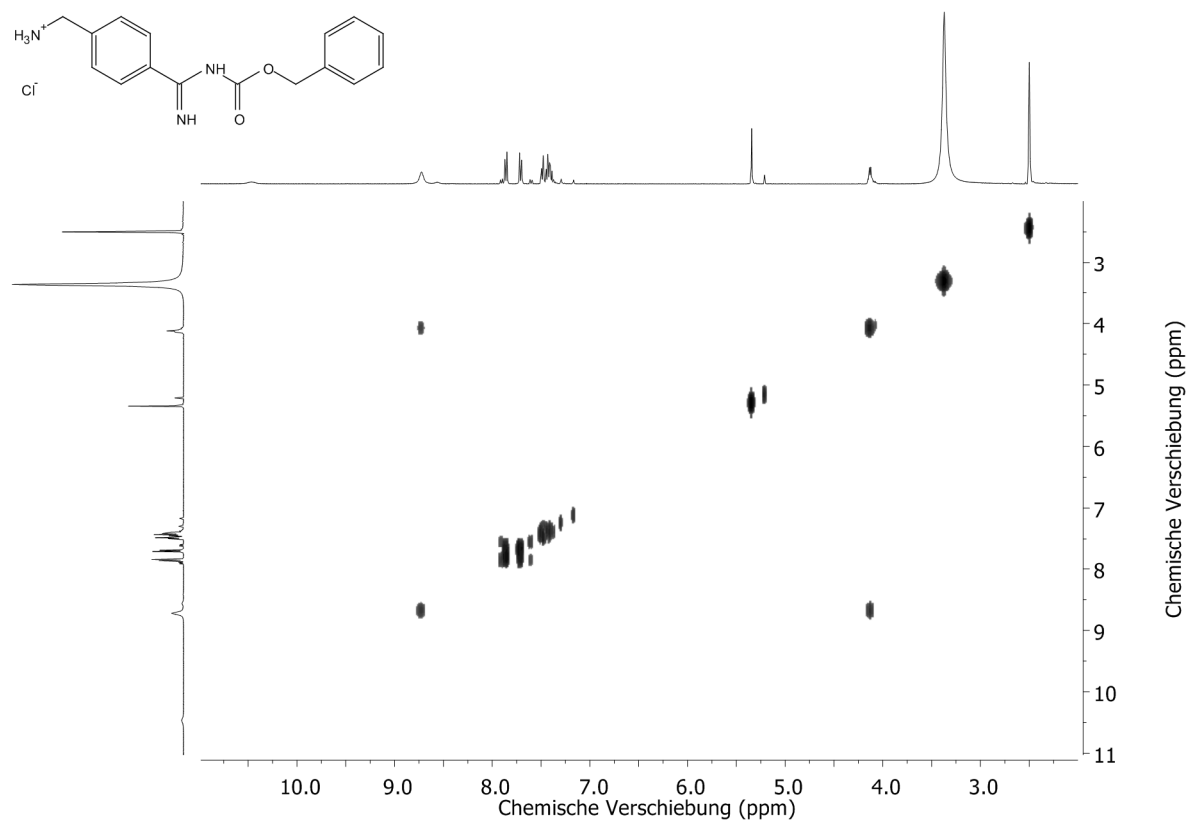


Abbildung 81: H,H-COSY -Spektrum der Verbindung **93** (400 MHz, DMSO-d_6).

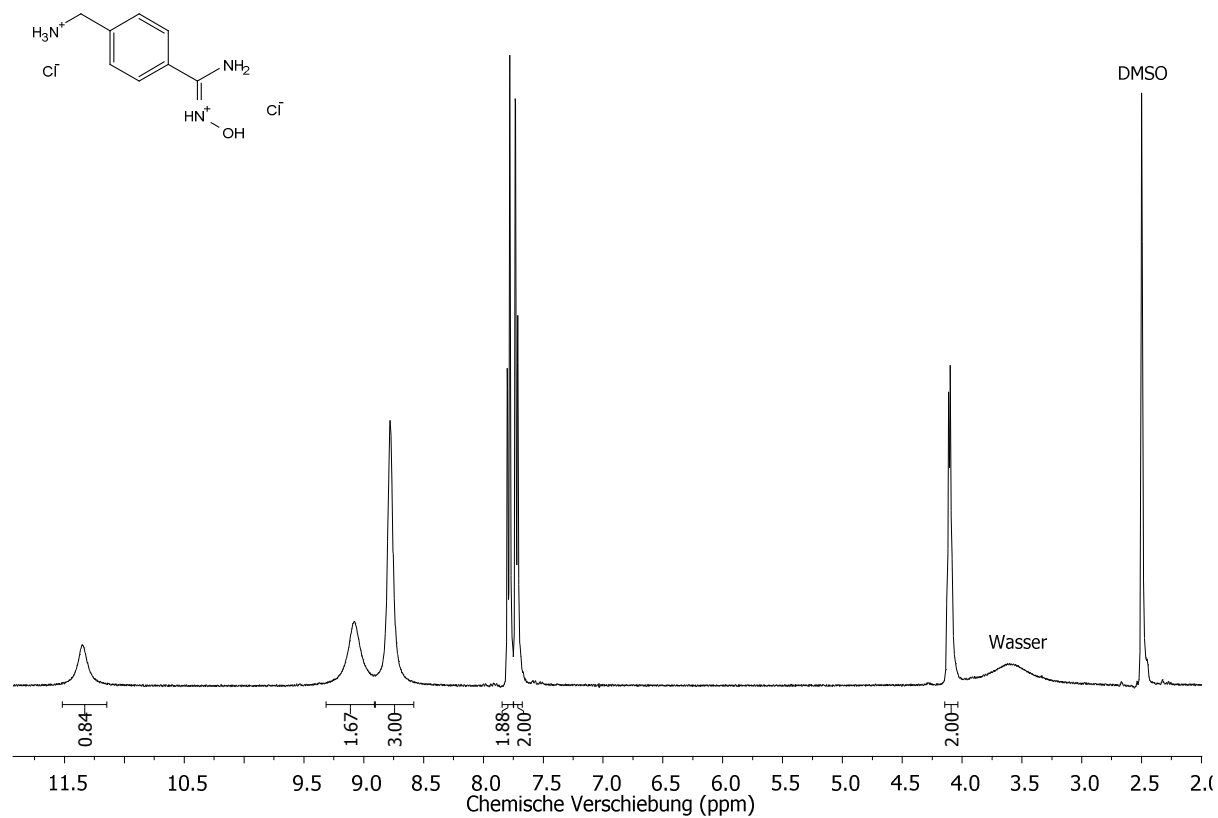


Abbildung 82: ¹H-Spektrum der Verbindung **94** (400 MHz, DMSO-d₆).

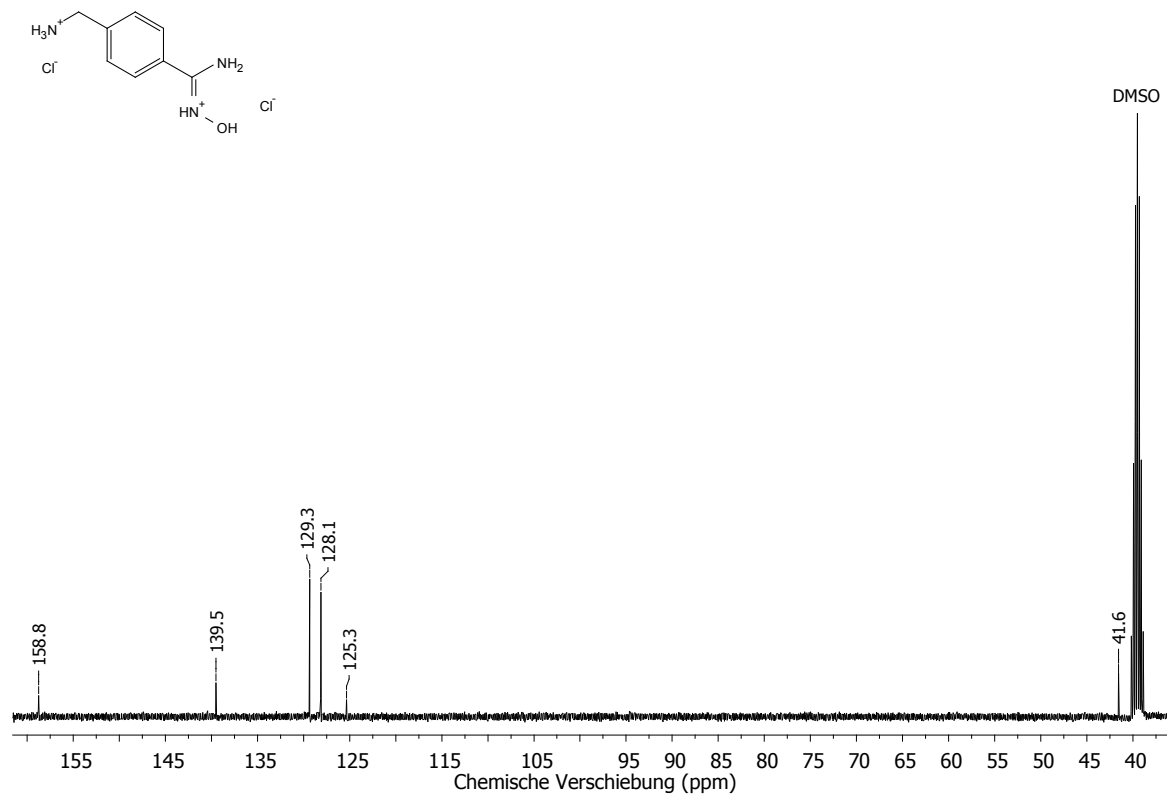


Abbildung 83: ¹³C-Spektrum der Verbindung **94** (101 MHz, DMSO-d₆).

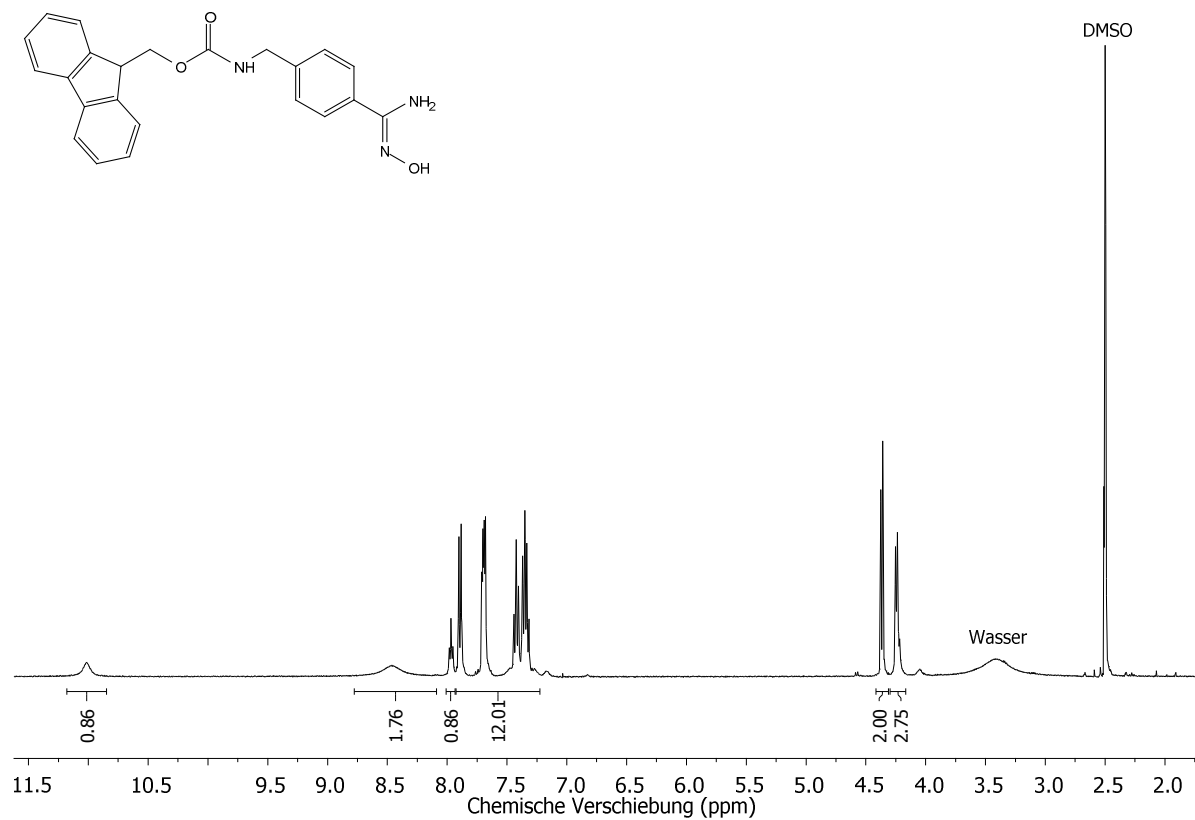


Abbildung 84: ¹H-Spektrum der Verbindung **95** (400 MHz, DMSO-d₆).

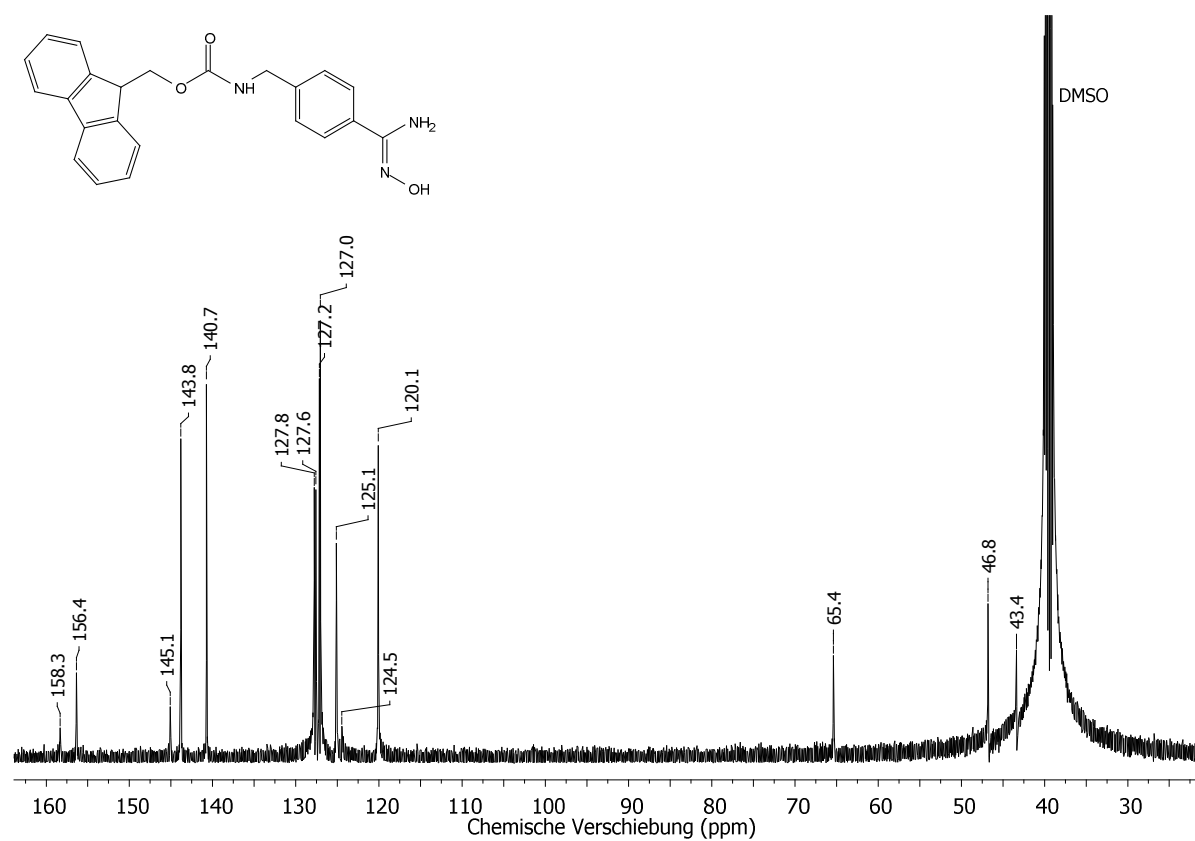


Abbildung 85: ¹³C-Spektrum der Verbindung **95** (126 MHz, DMSO-d₆).

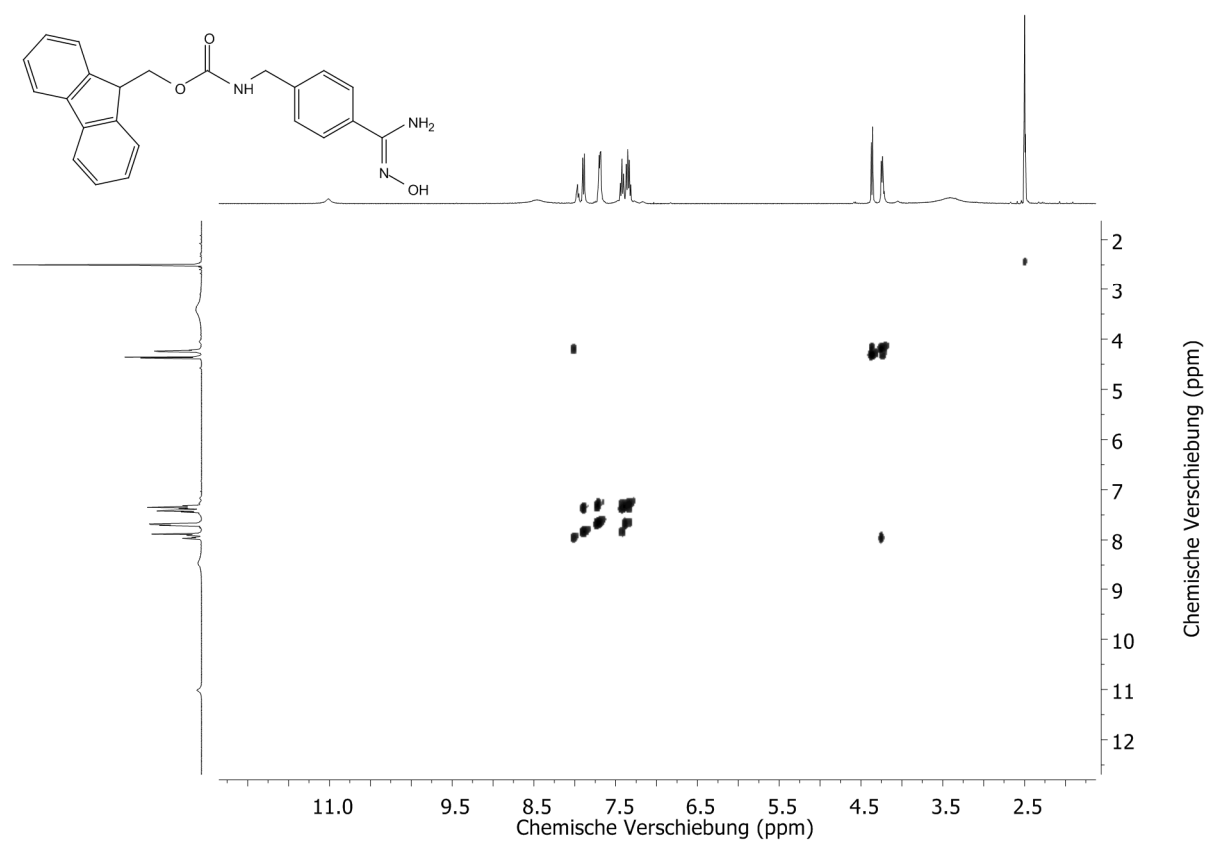


Abbildung 86: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **95** (500 MHz, DMSO-d_6).

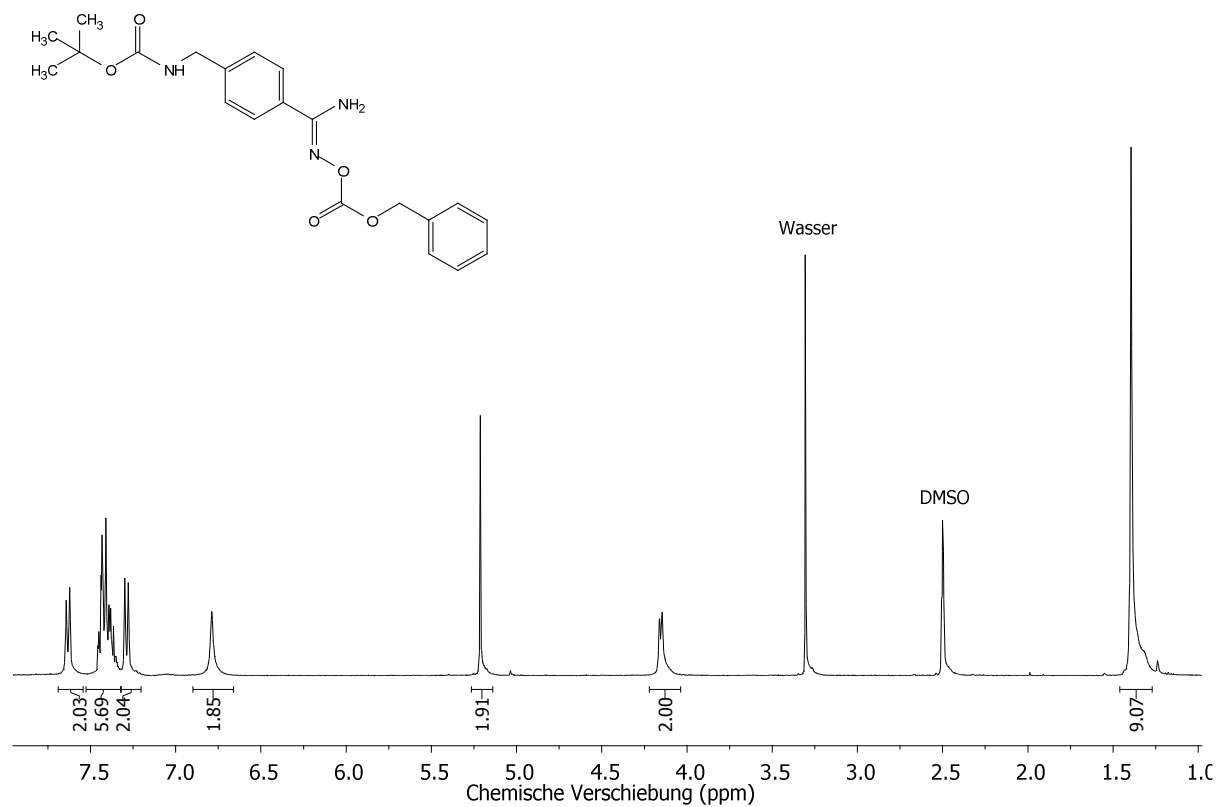


Abbildung 87: ¹H-Spektrum der Verbindung **96** (400 MHz, DMSO-d₆).

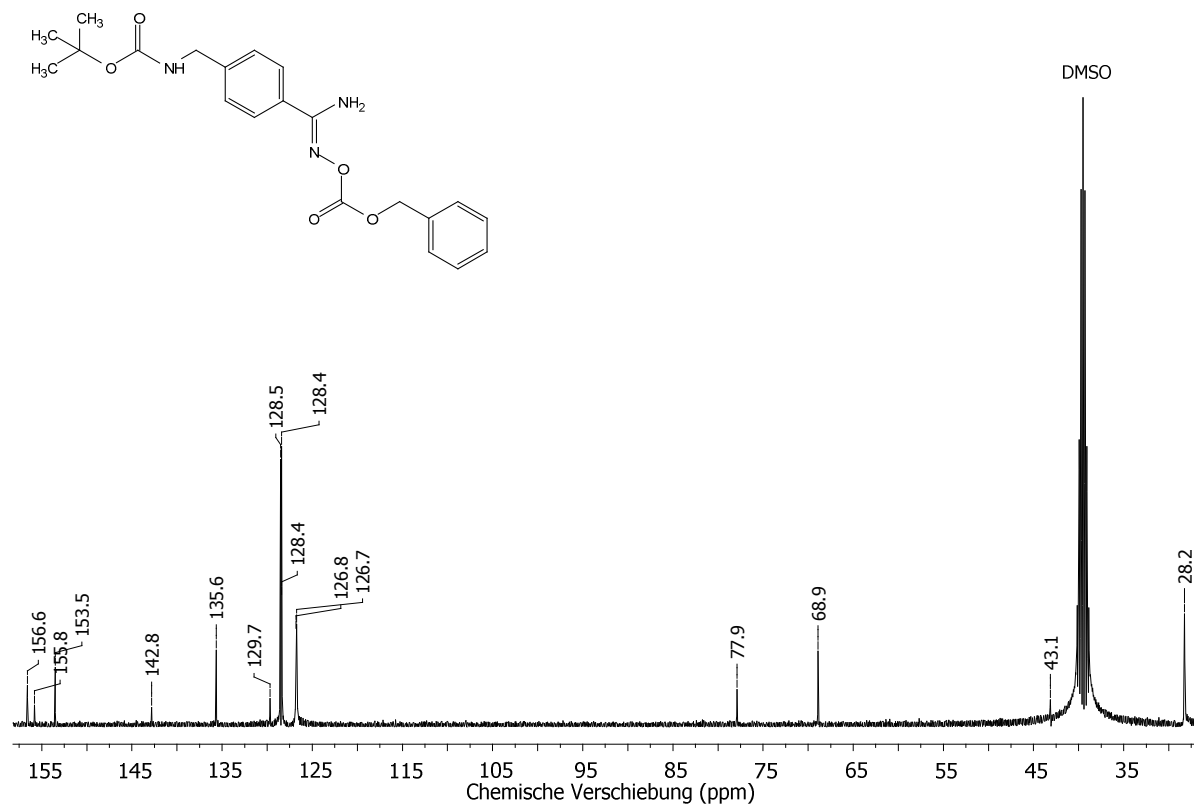


Abbildung 88: ¹³C-Spektrum der Verbindung **96** (101 MHz, DMSO-d₆).

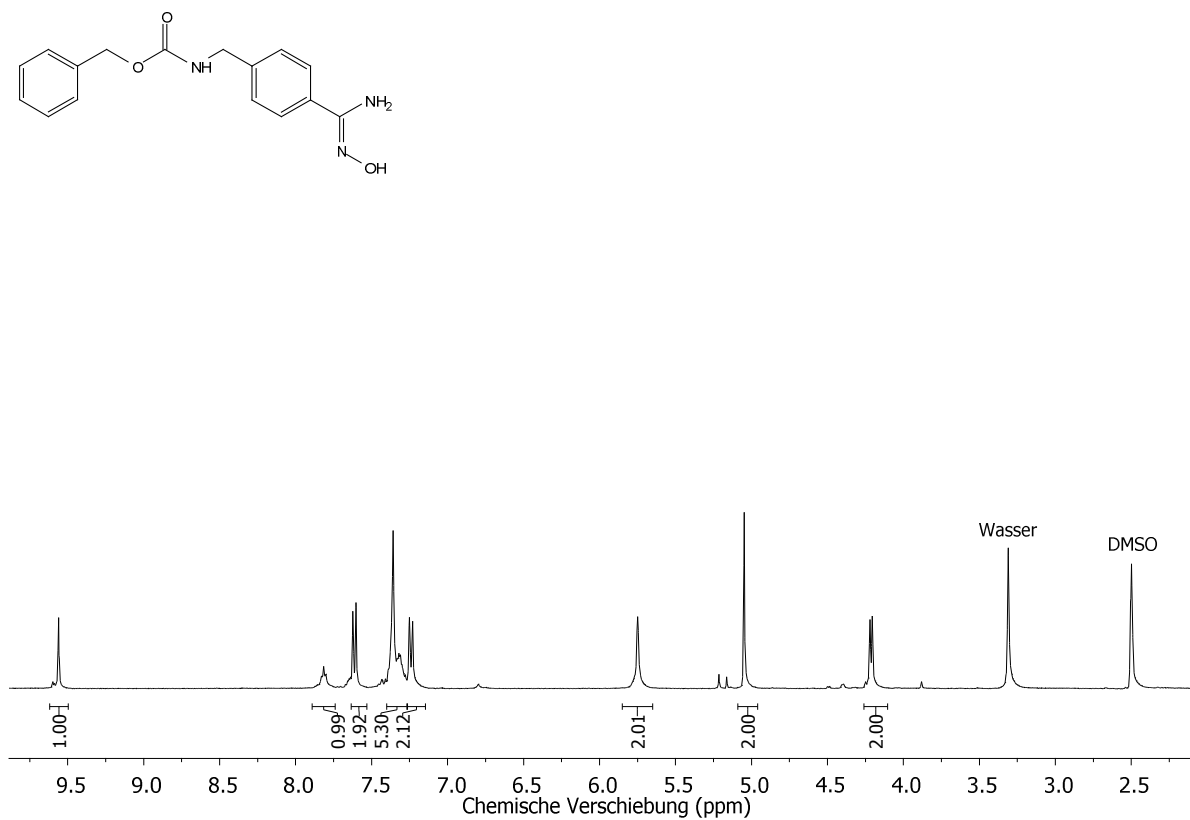


Abbildung 89: ¹H-Spektrum der Verbindung 97 (400 MHz, DMSO-d₆).

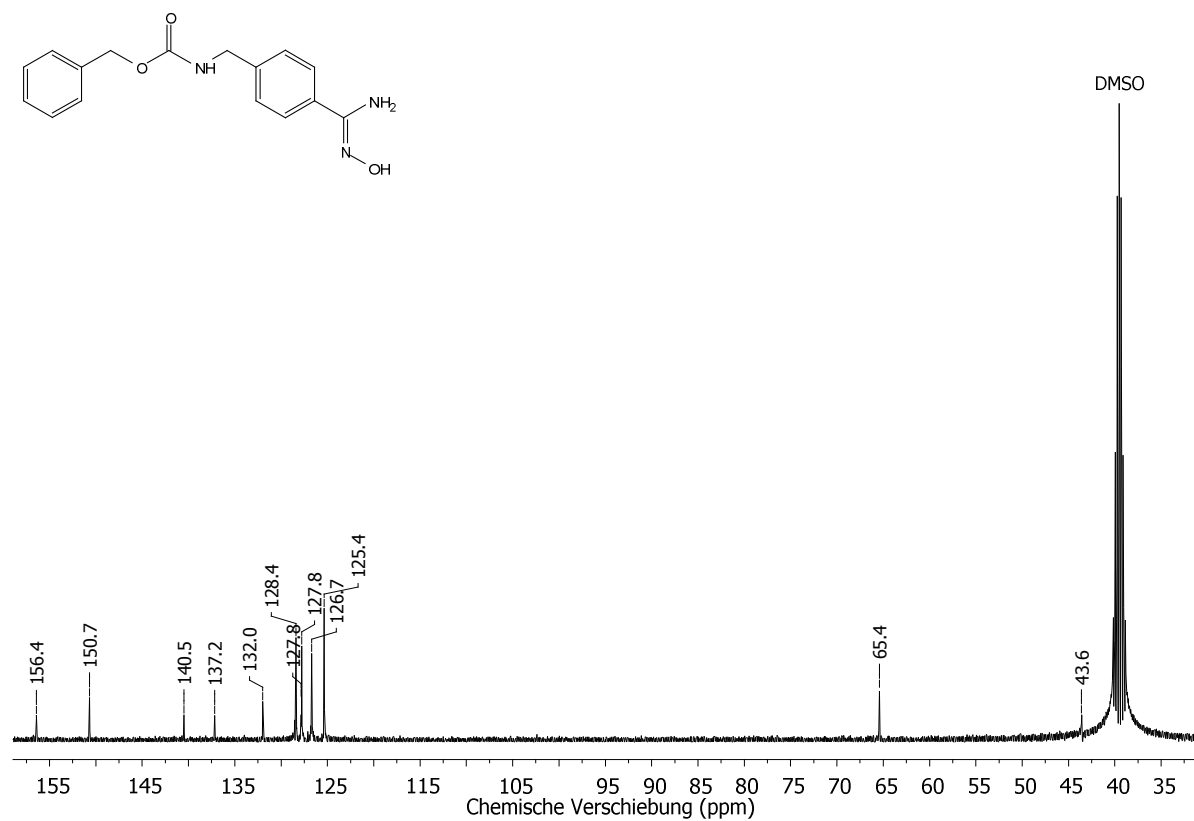


Abbildung 90: ¹³C-Spektrum der Verbindung 97 (101 MHz, DMSO-d₆).

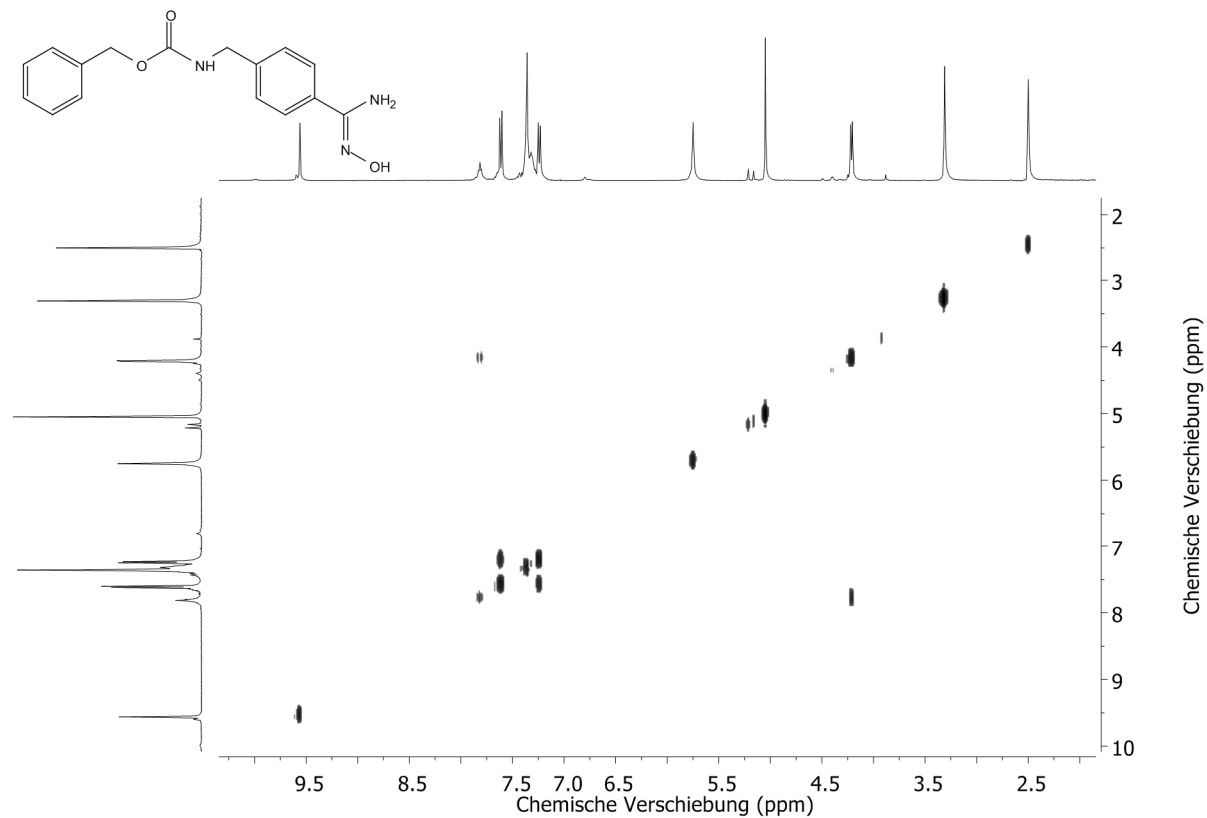


Abbildung 91: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **97** (400 MHz, DMSO-d_6).

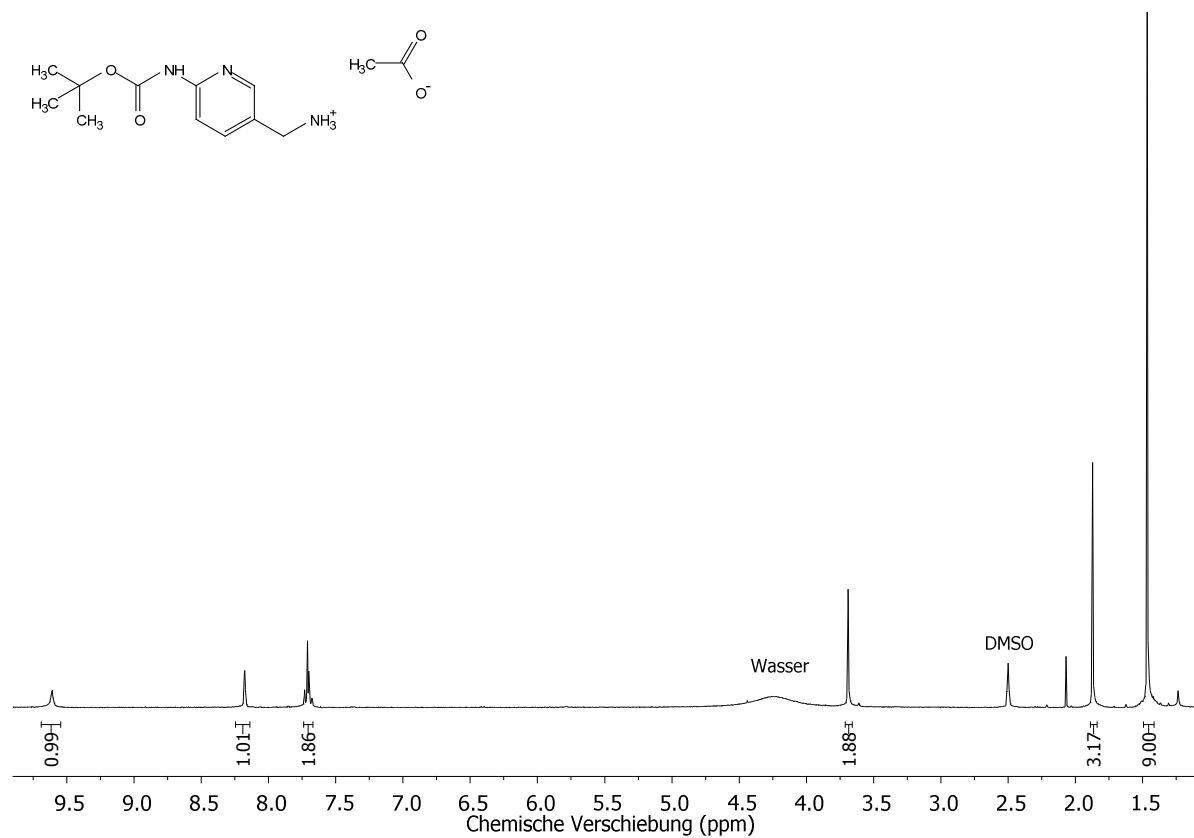


Abbildung 92: ^1H -Spektrum der Verbindung **98** (400 MHz, DMSO-d_6).

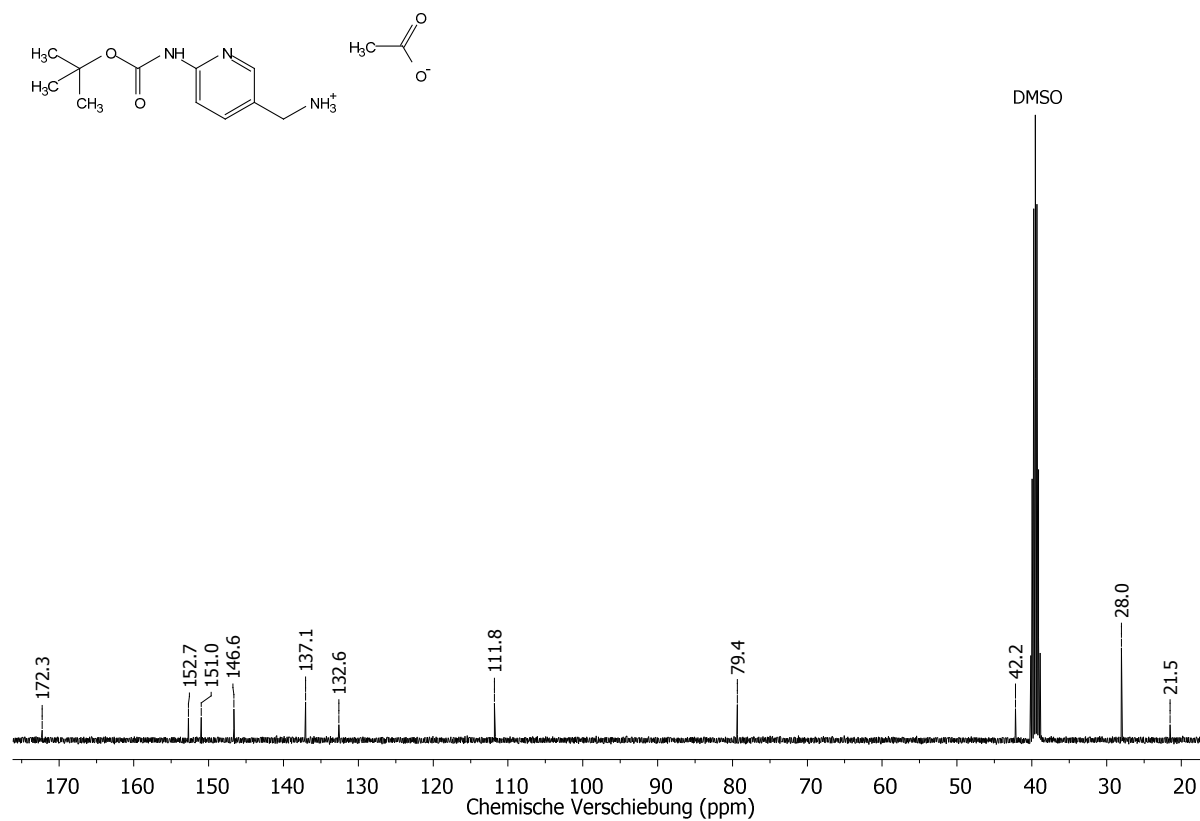


Abbildung 93: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **98** (101 MHz, DMSO-d_6).

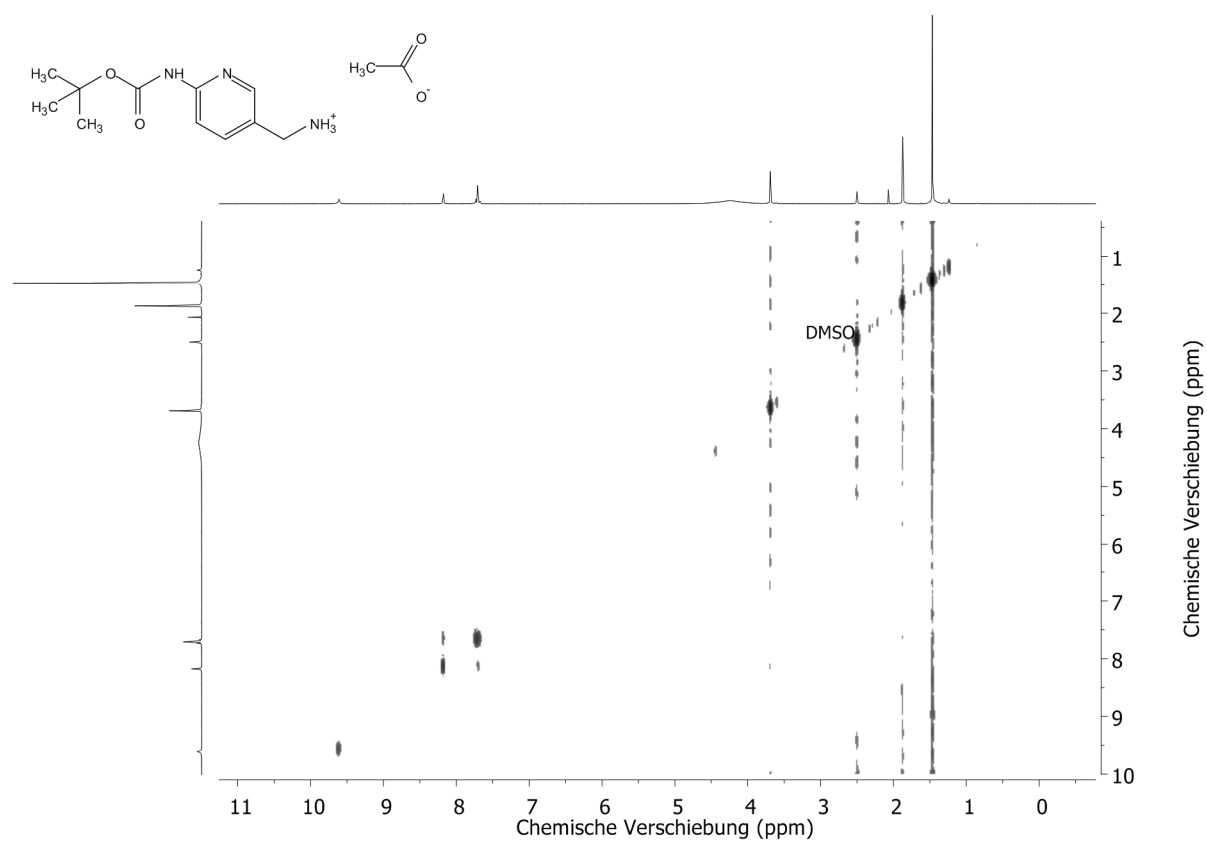


Abbildung 94: H₂H-COSY-Spektrum der Verbindung **98** (400 MHz, DMSO-d₆).

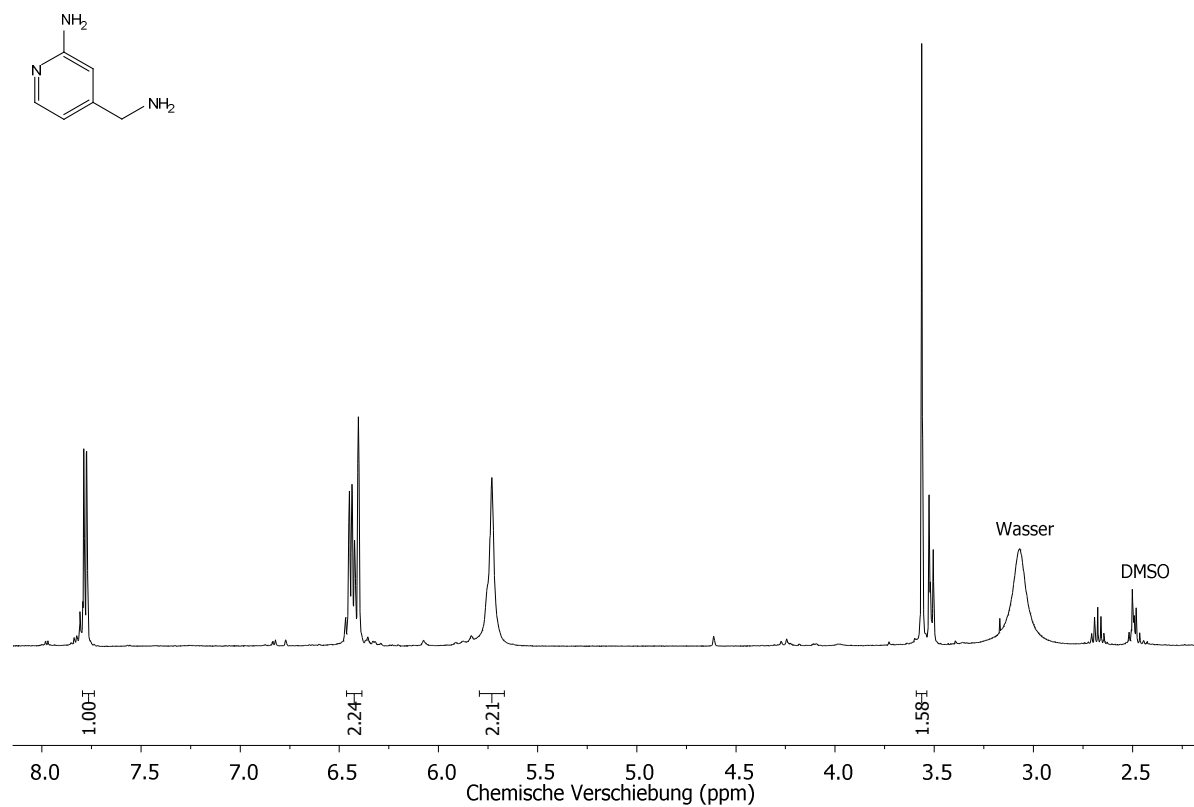


Abbildung 95: ^1H -Spektrum der Verbindung **100** (400 MHz, DMSO-d_6).

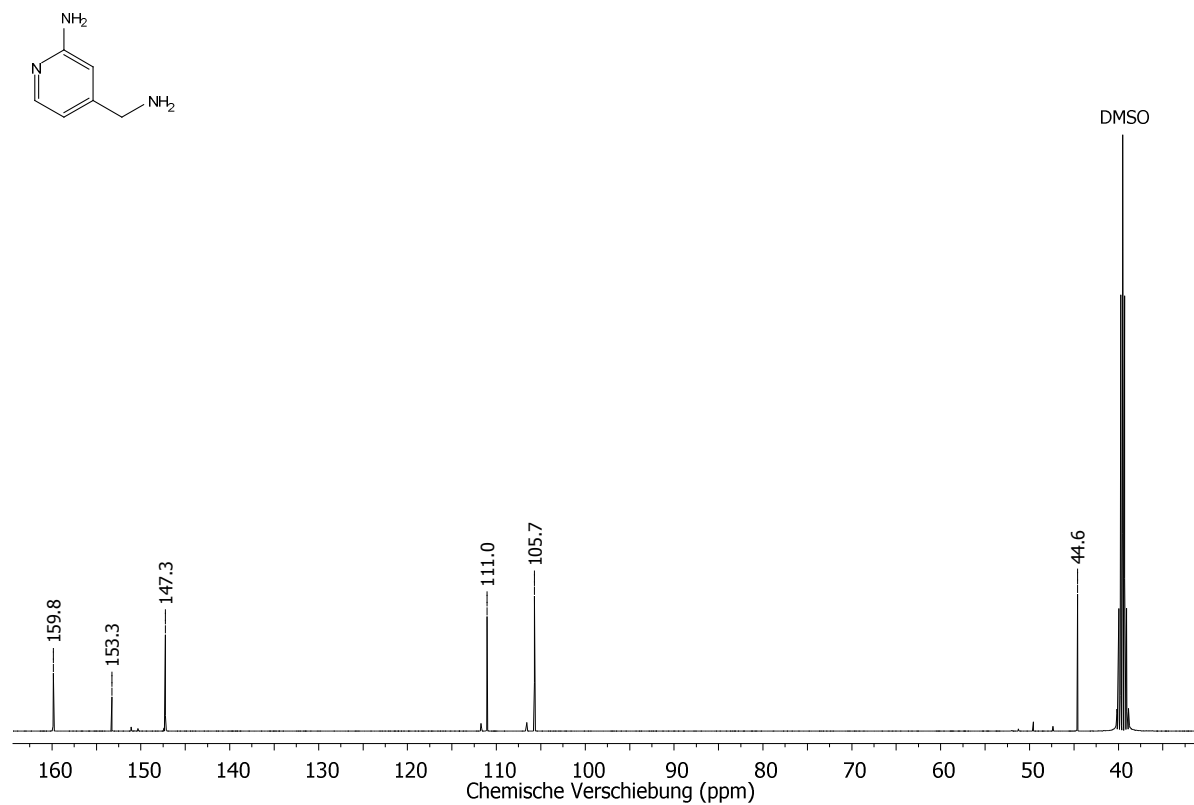


Abbildung 96: ^{13}C -Spektrum der Verbindung **100** (101 MHz, DMSO-d_6).

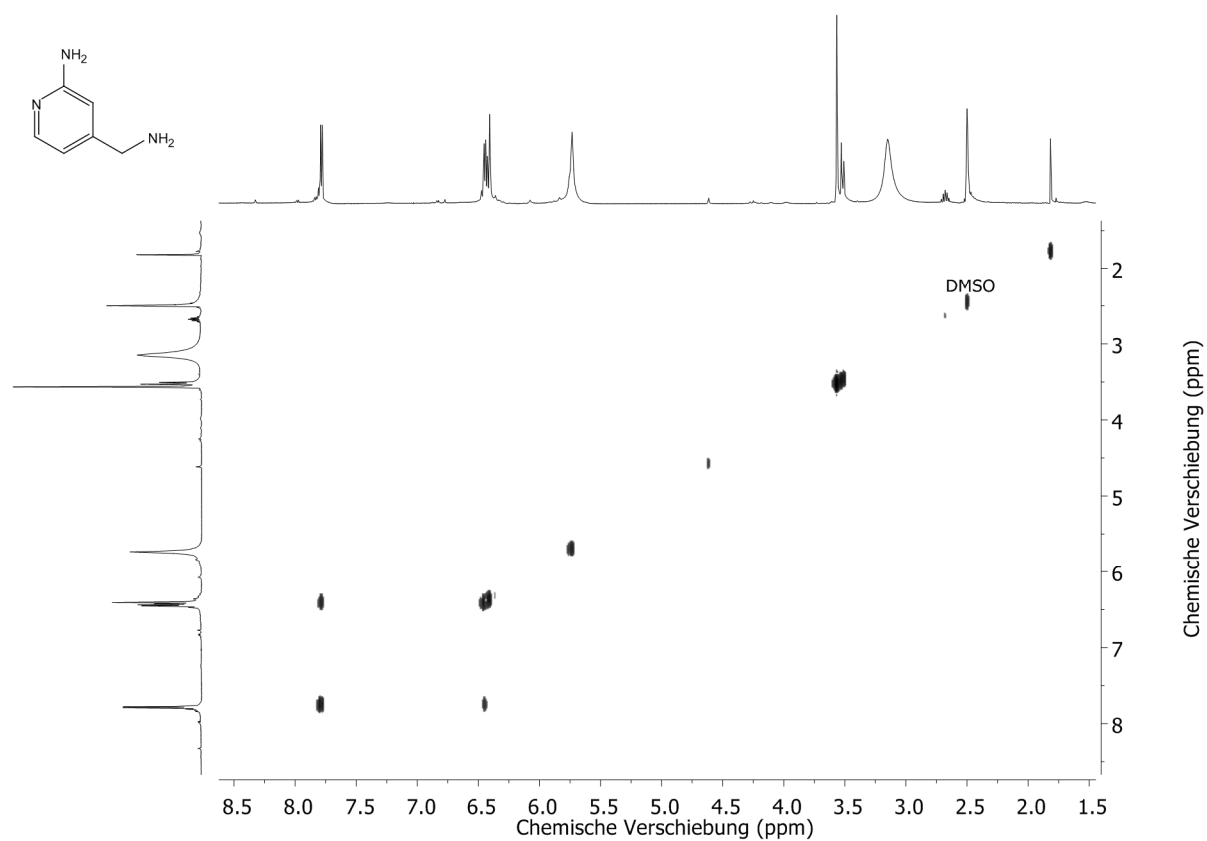


Abbildung 97: ¹H-¹H-COSY-Spektrum der Verbindung **100** (400 MHz, DMSO-d₆).

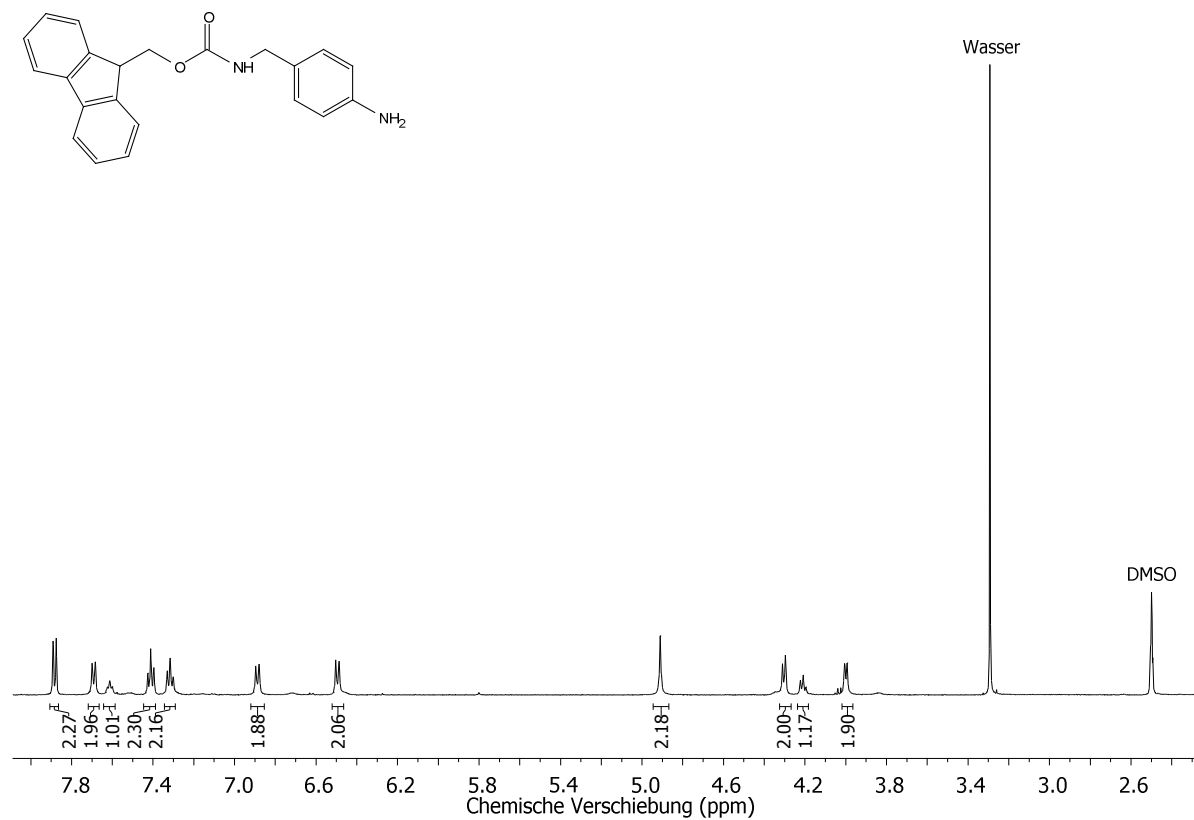


Abbildung 98: ¹H-Spektrum der Verbindung **101** (500 MHz, DMSO-d₆).

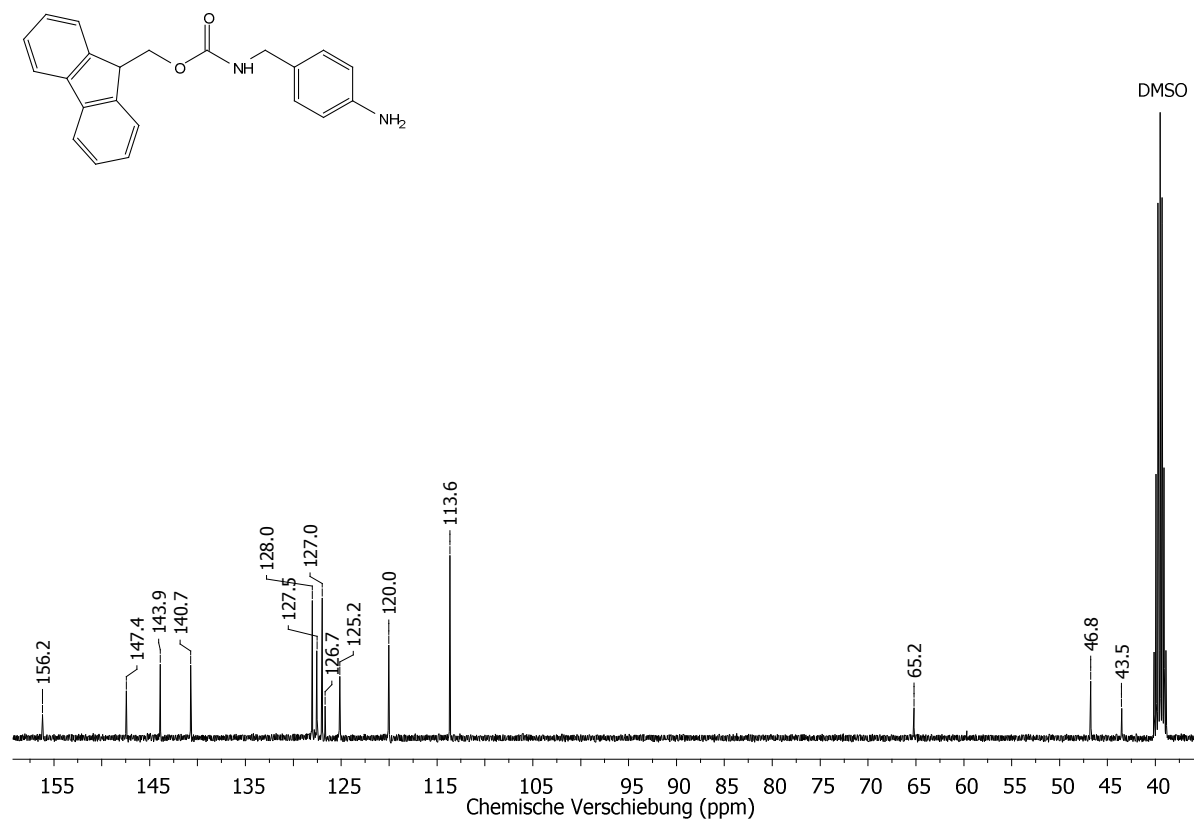
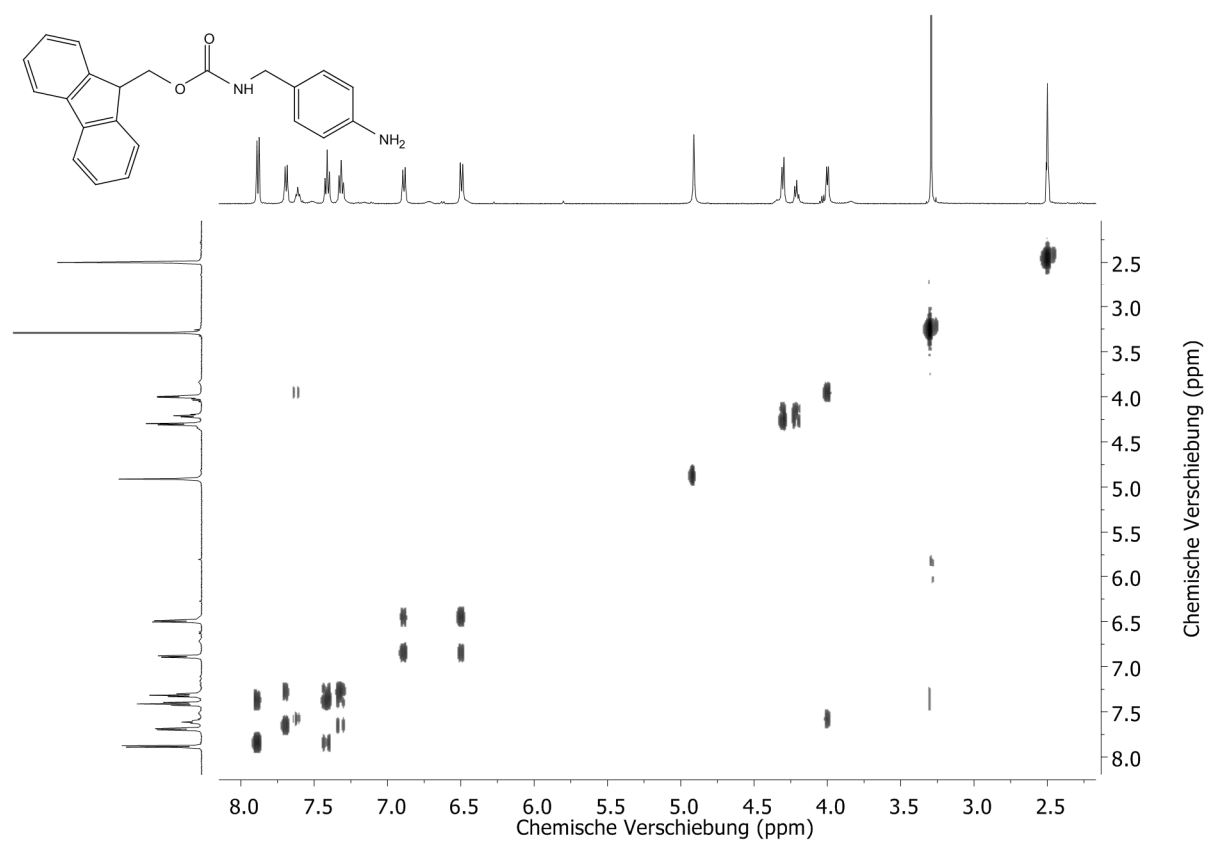


Abbildung 99: ¹³C-Spektrum der Verbindung **101** (101 MHz, DMSO-d₆).



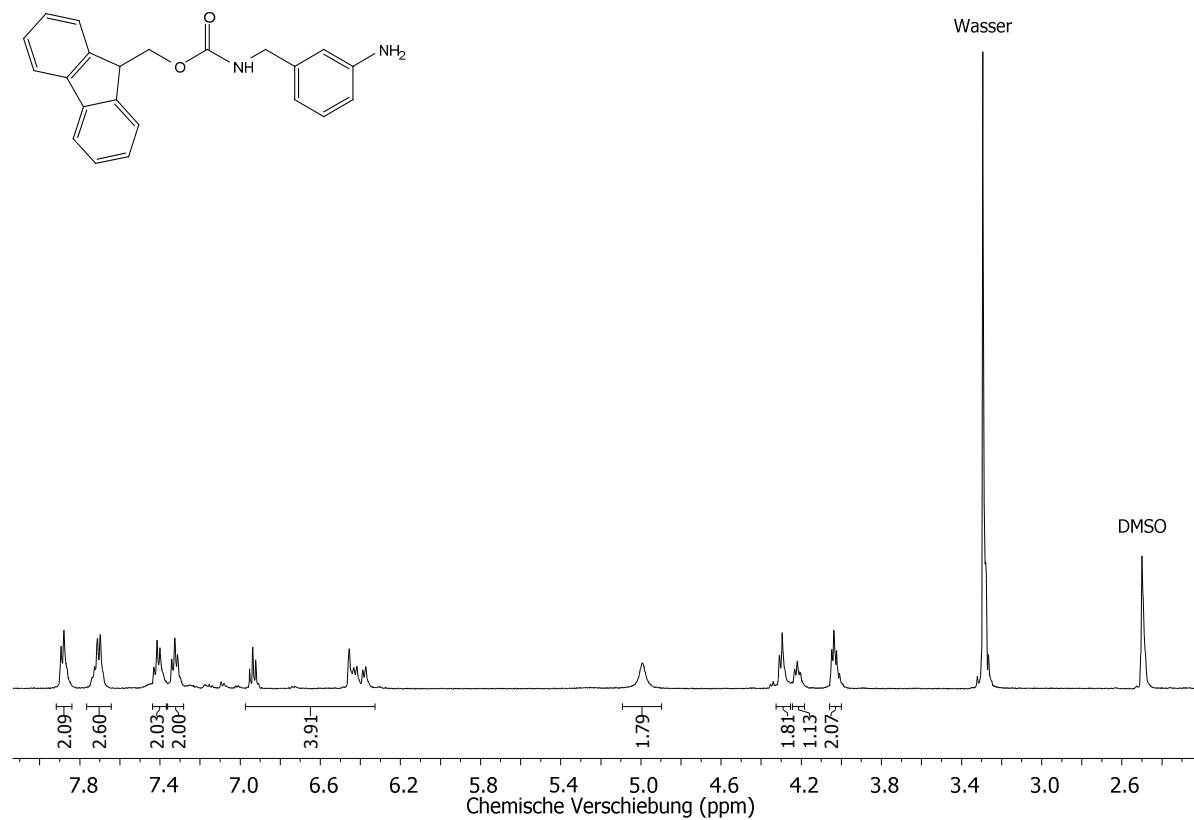


Abbildung 101: ¹H-Spektrum der Verbindung **102** (500 MHz, DMSO-d₆).

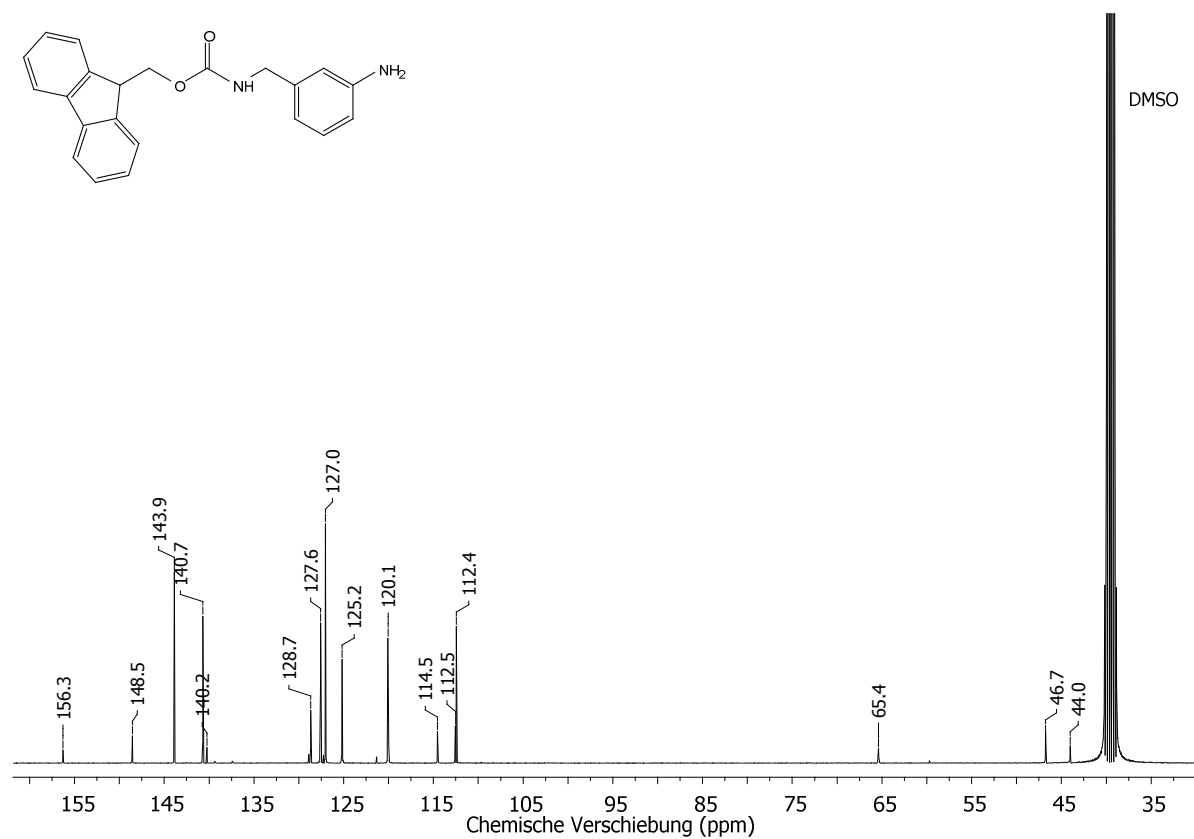


Abbildung 102: ¹³C-Spektrum der Verbindung **102** (101 MHz, DMSO-d₆).

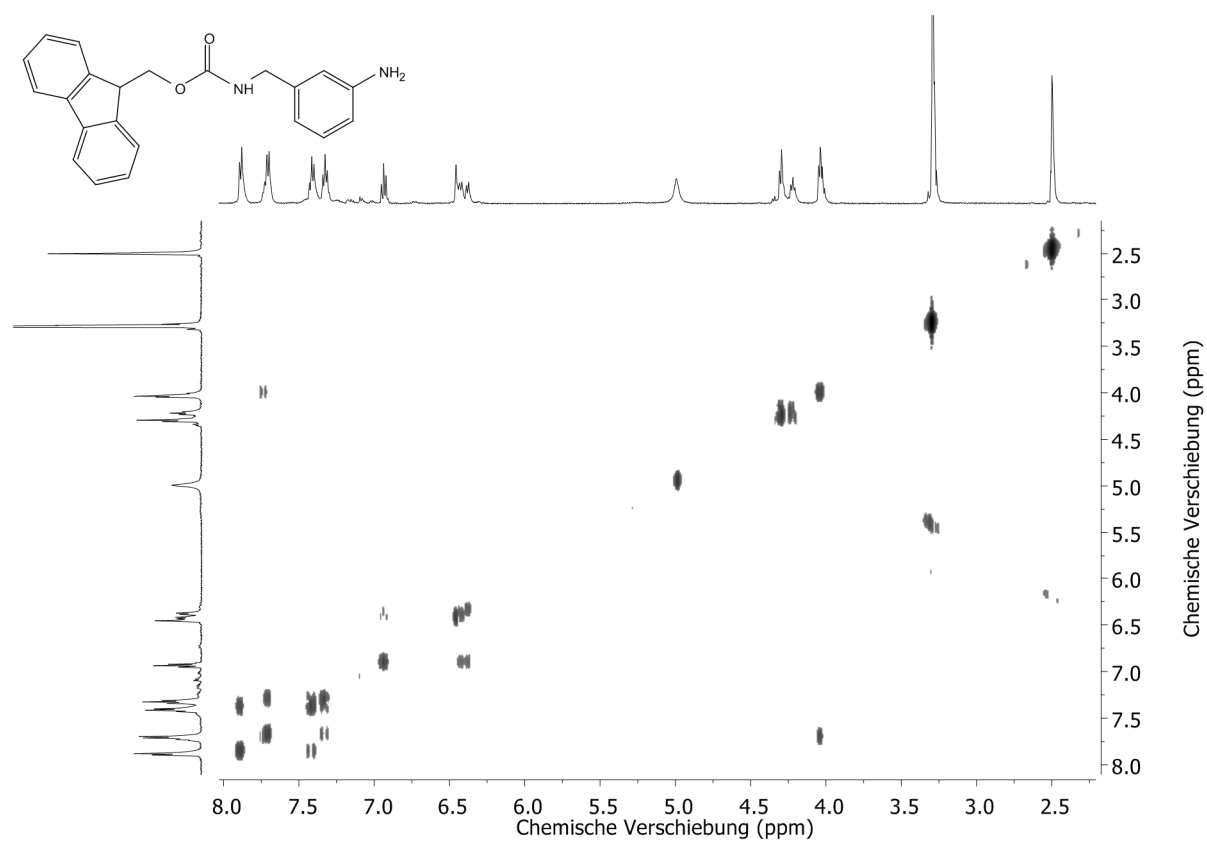


Abbildung 103: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **102** (400 MHz, DMSO-d_6).

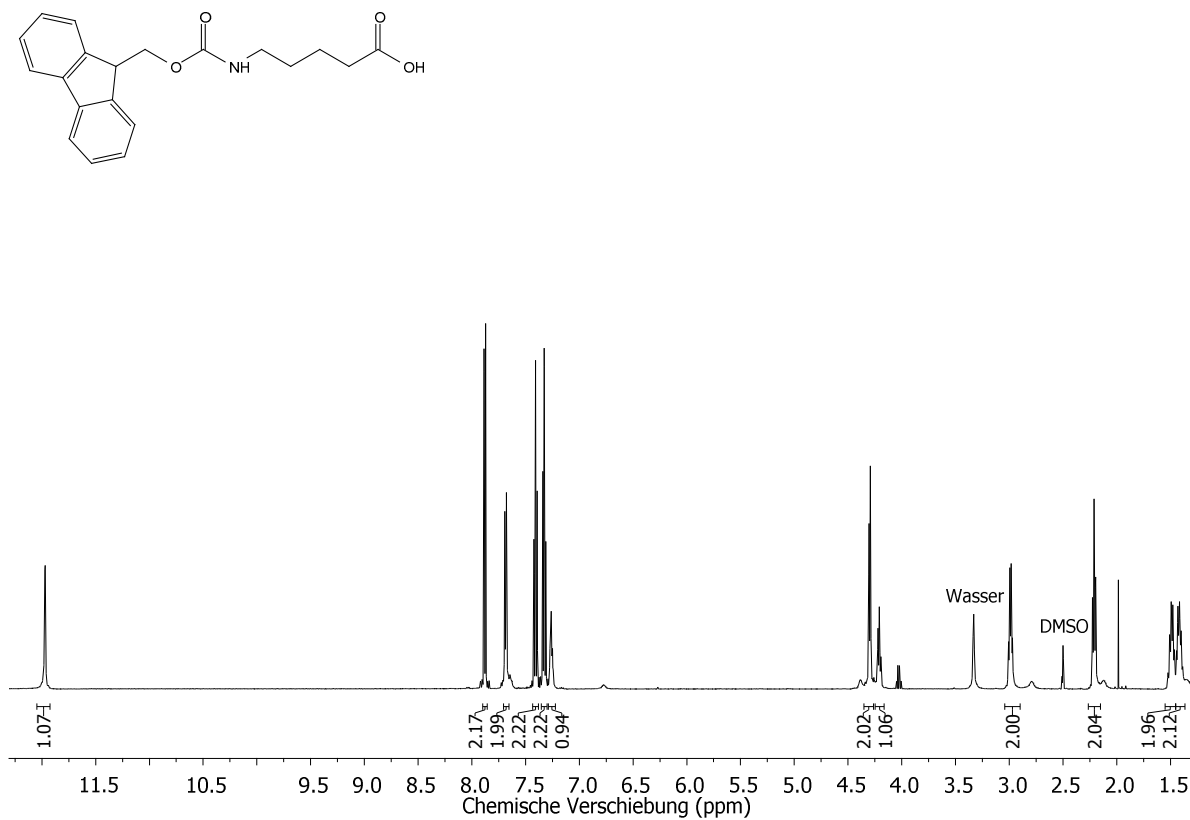


Abbildung 104: ¹H-Spektrum der Verbindung **Fmoc-5-Ava-OH** (500 MHz, DMSO-d₆).

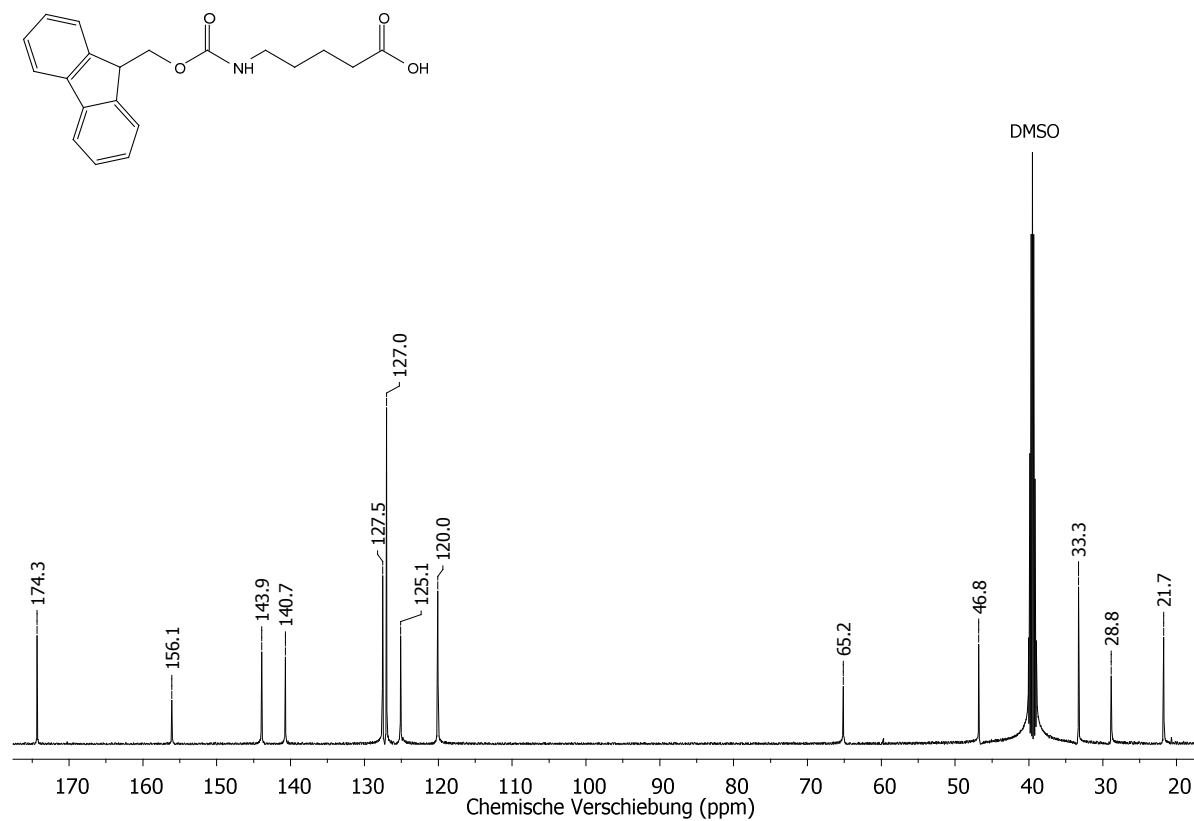


Abbildung 105: ¹³C-Spektrum der Verbindung **Fmoc-5-Ava-OH** (126 MHz, DMSO-d₆).

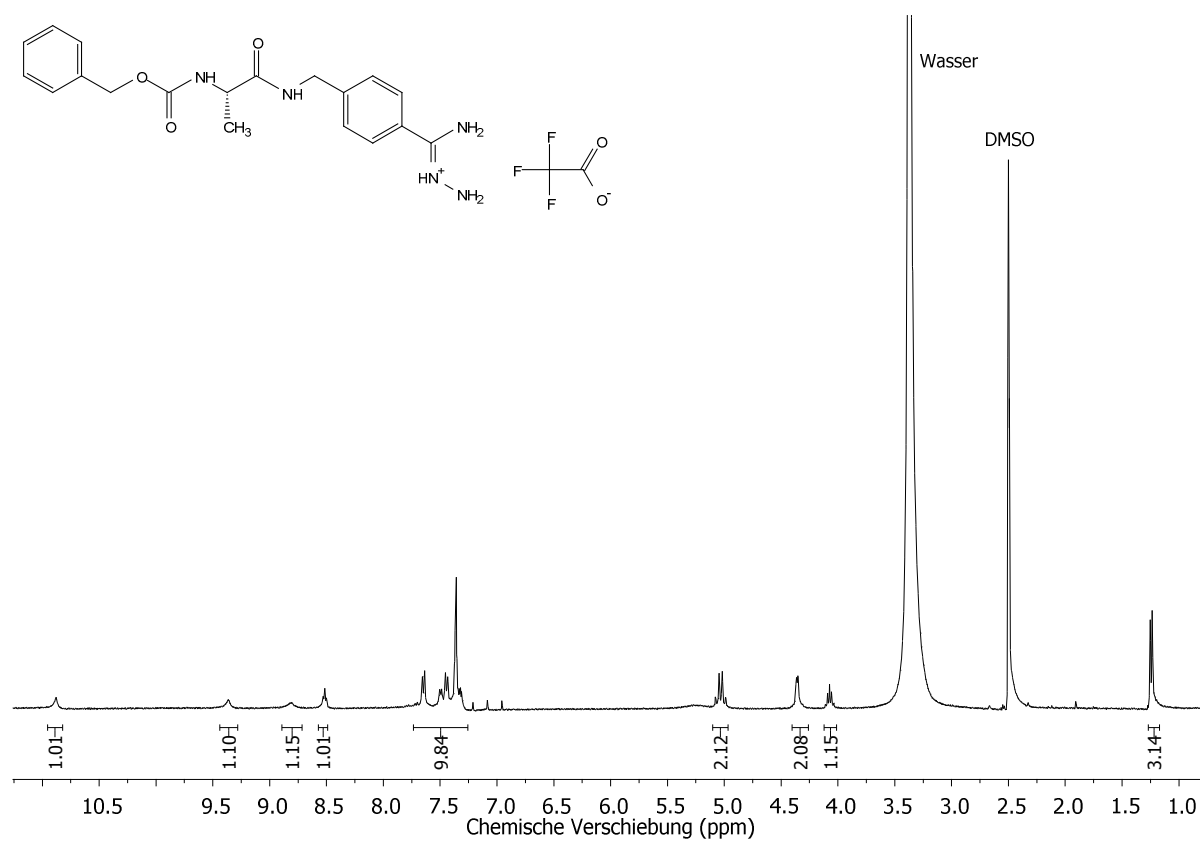


Abbildung 106: ^1H -Spektrum der Verbindung **103** (500 MHz, DMSO-d_6).

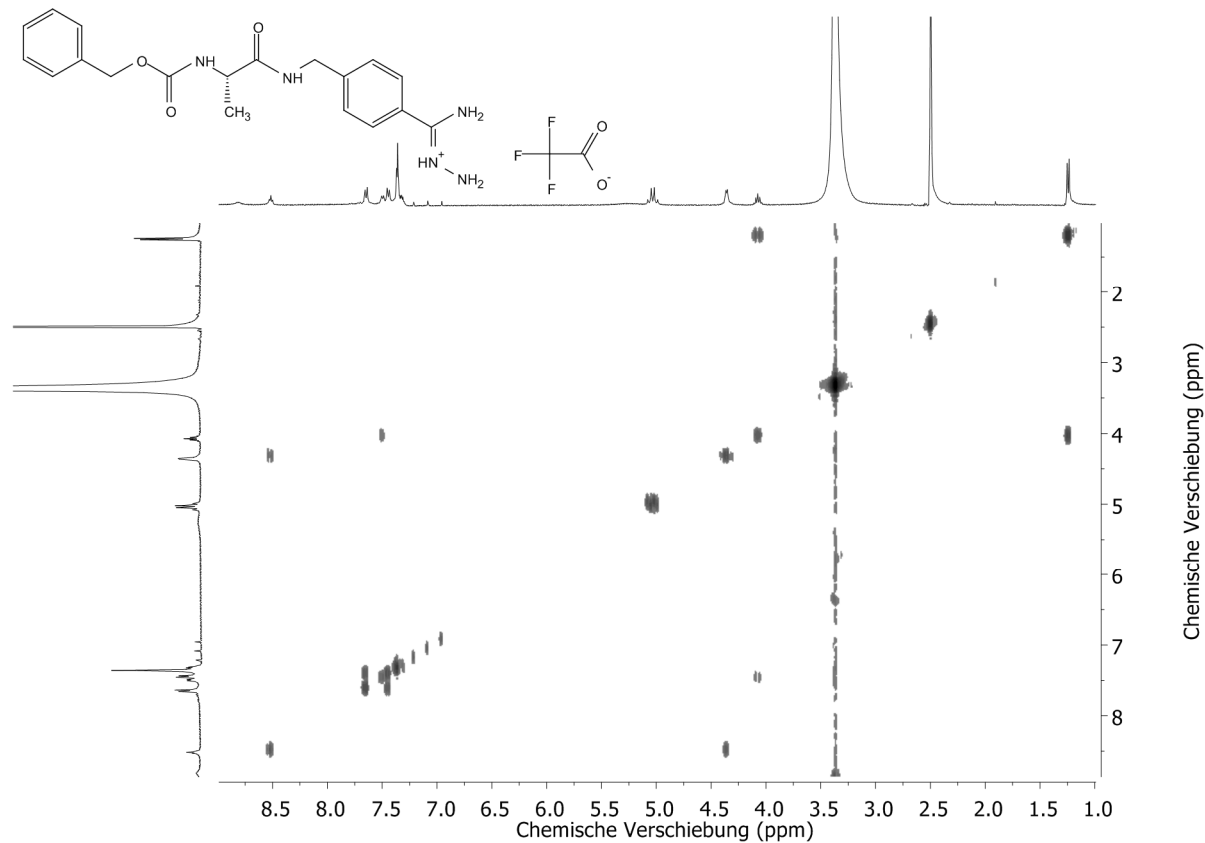


Abbildung 107: H,H-COSY -Spektrum der Verbindung **103** (400 MHz, DMSO-d_6).

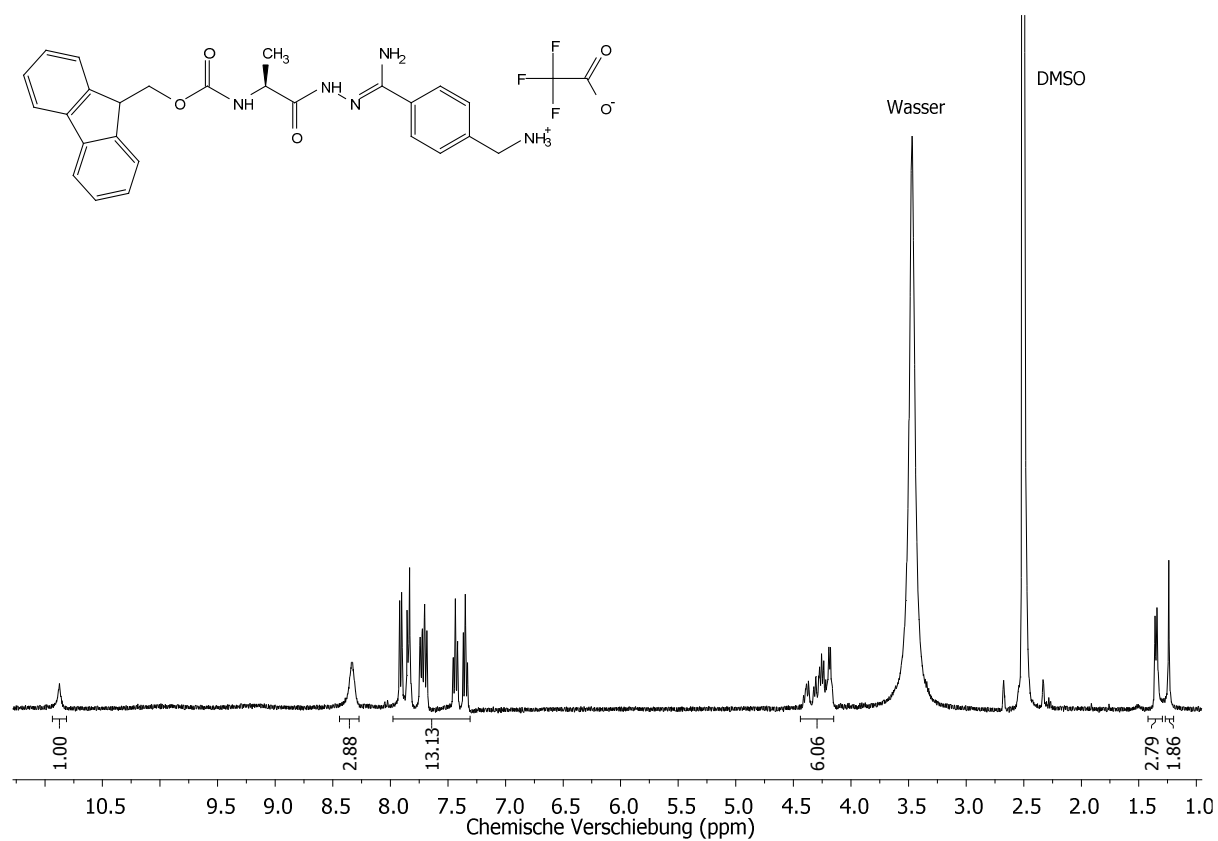


Abbildung 108: ^1H -Spektrum der Verbindung **104** (400 MHz, DMSO-d_6).

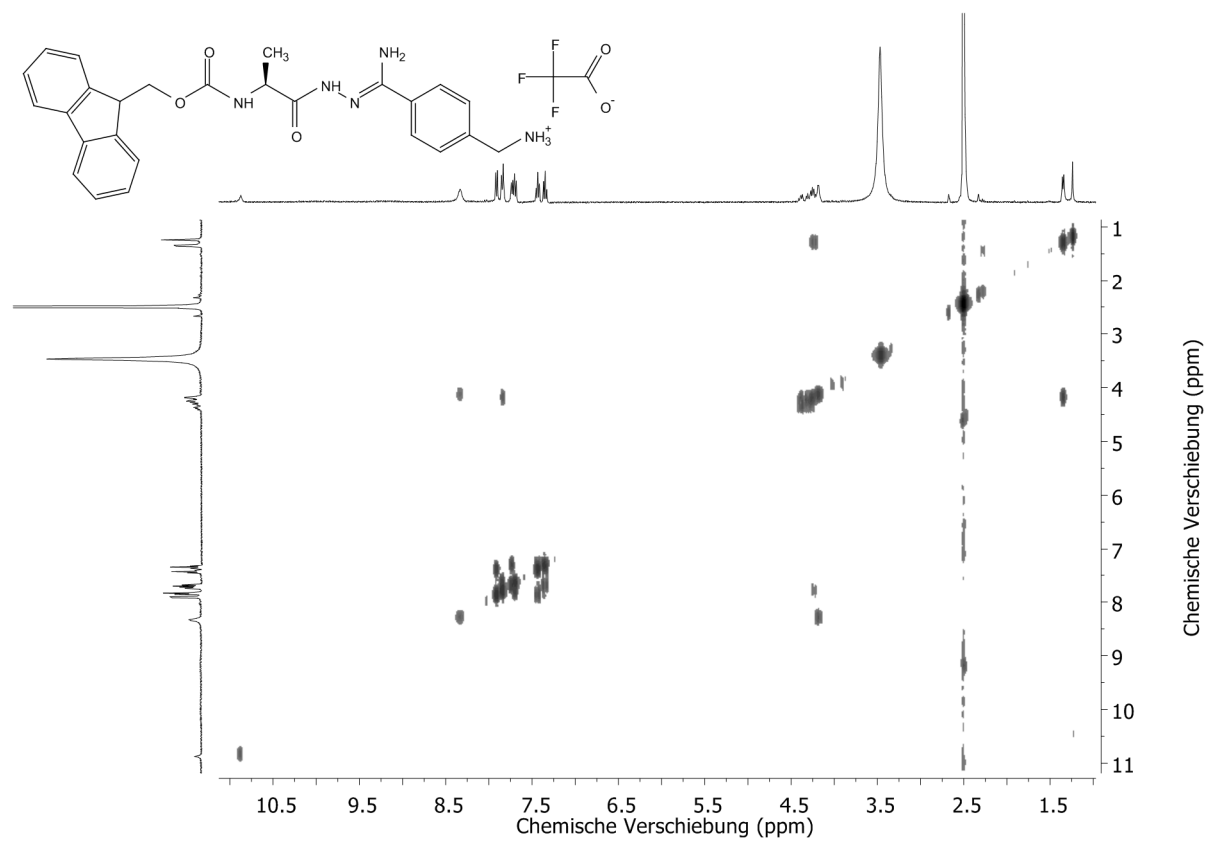


Abbildung 109: H,H-COSY -Spektrum der Verbindung **104** (400 MHz, DMSO-d_6).

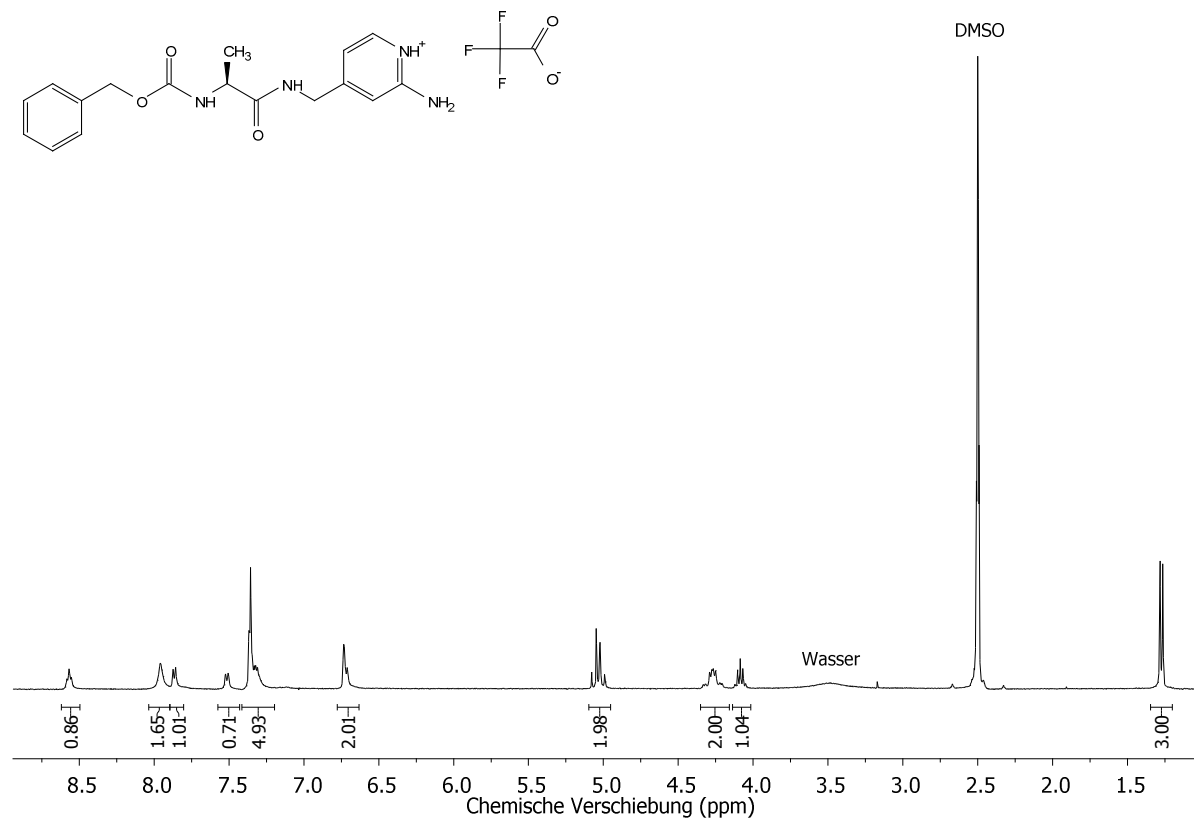


Abbildung 110: ¹H-Spektrum der Verbindung **105** (400 MHz, DMSO-d₆).

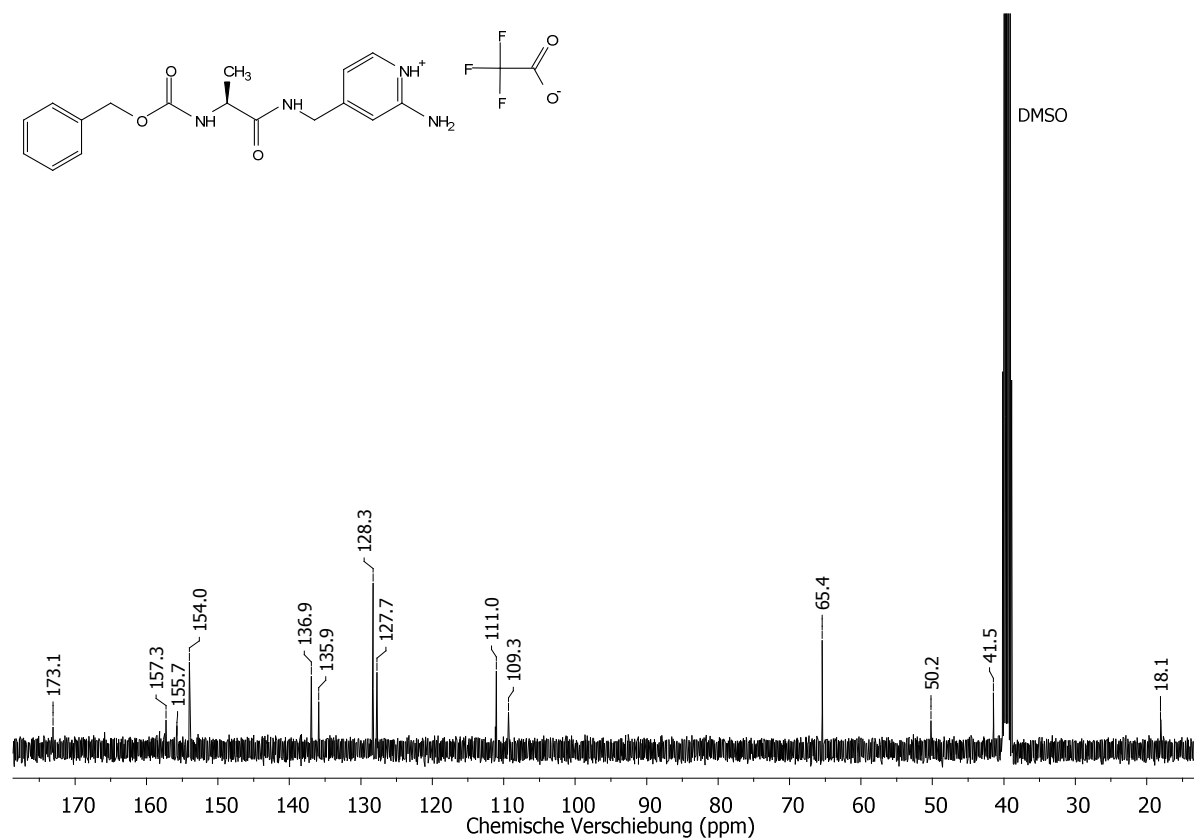


Abbildung 111: ¹³C-Spektrum der Verbindung **105** (101 MHz, DMSO-d₆).

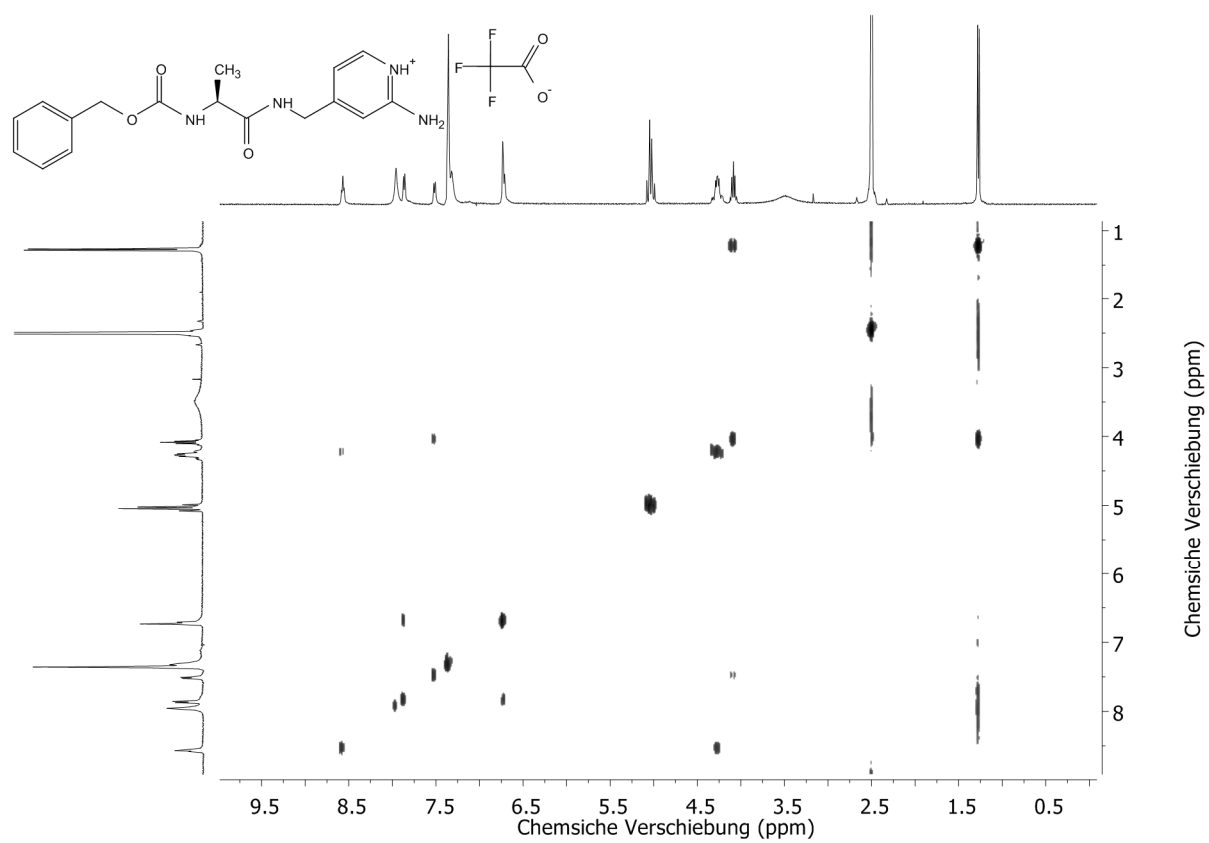


Abbildung 112: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **105** (400 MHz, DMSO-d_6).

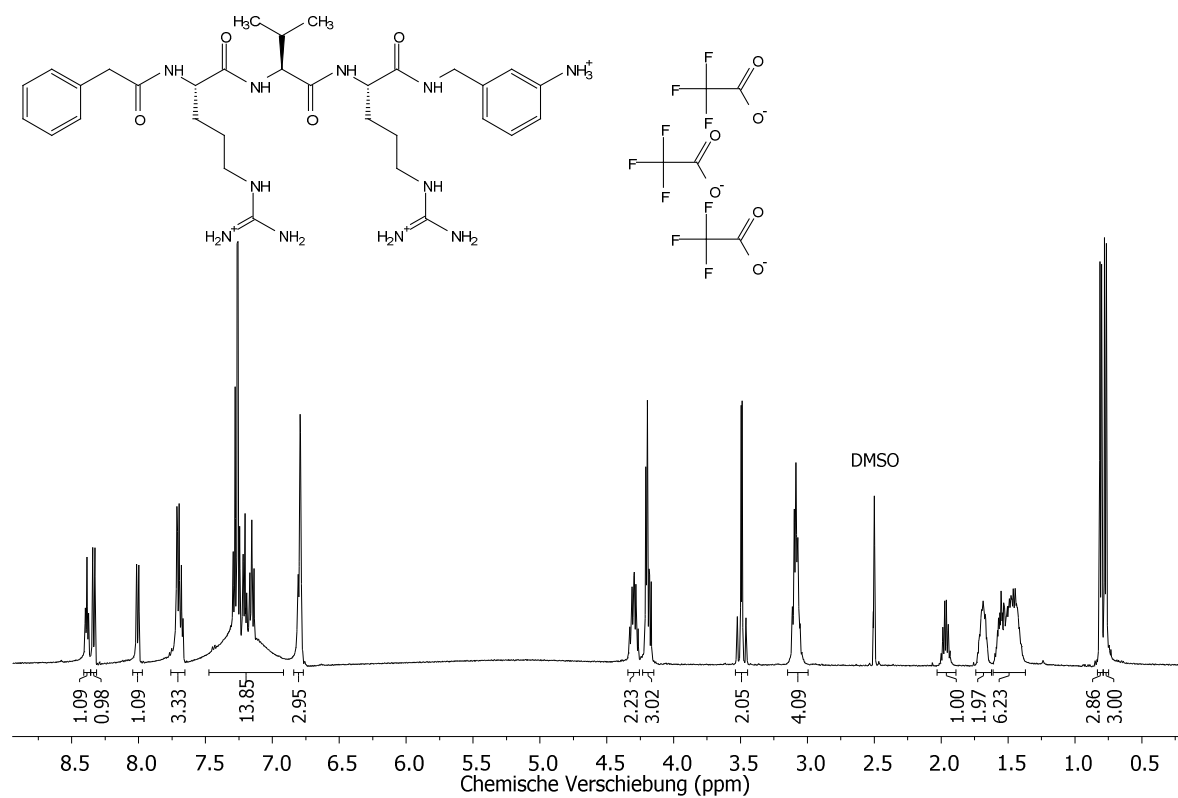


Abbildung 113: ^1H -Spektrum des Inhibitors **59** (500 MHz, DMSO- d_6).

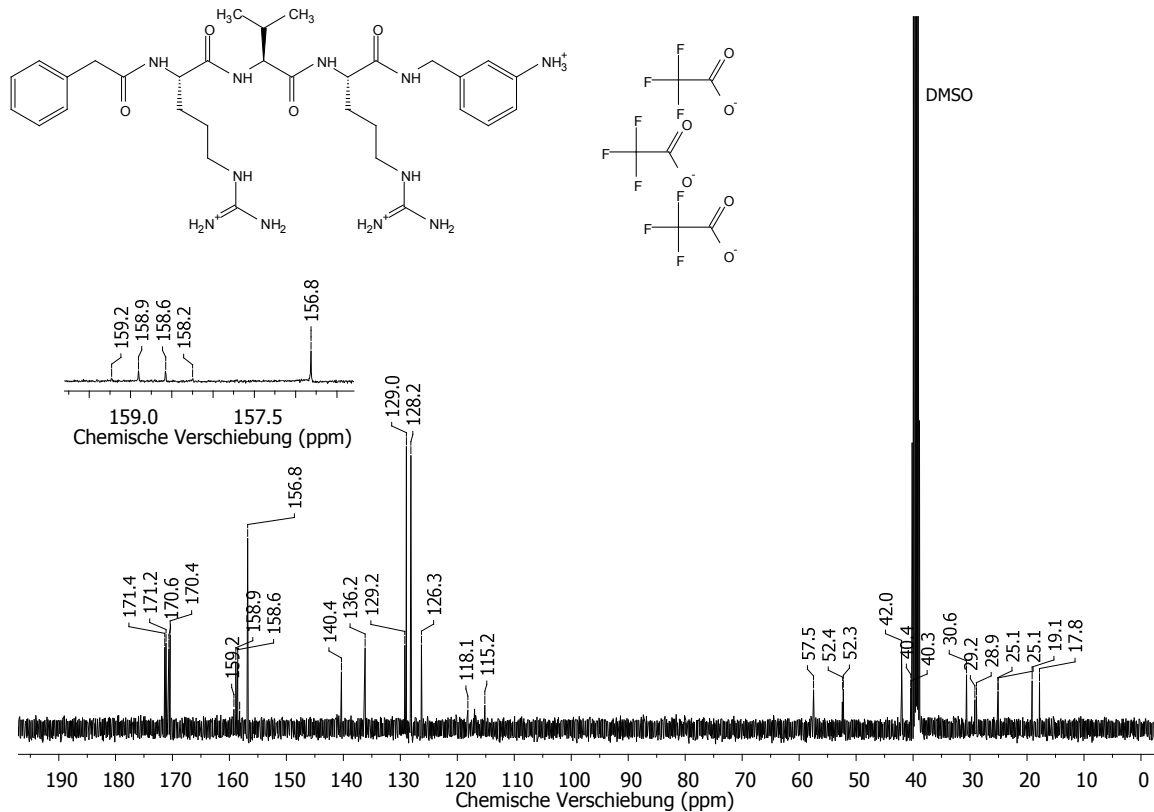


Abbildung 114: ^{13}C -Spektrum des Inhibitors **59** (101 MHz, DMSO- d_6).

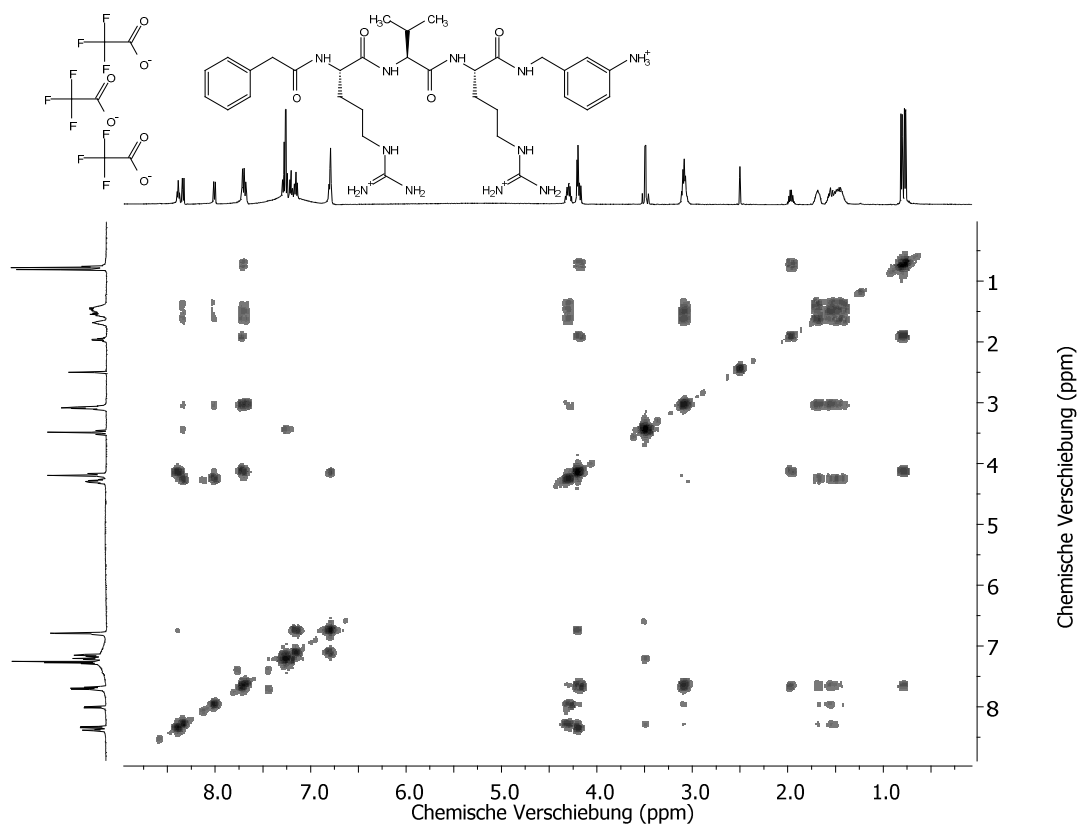


Abbildung 115: H,H-TOCSY-Spektrum des Inhibitors **59** (500 MHz, DMSO- d_6).

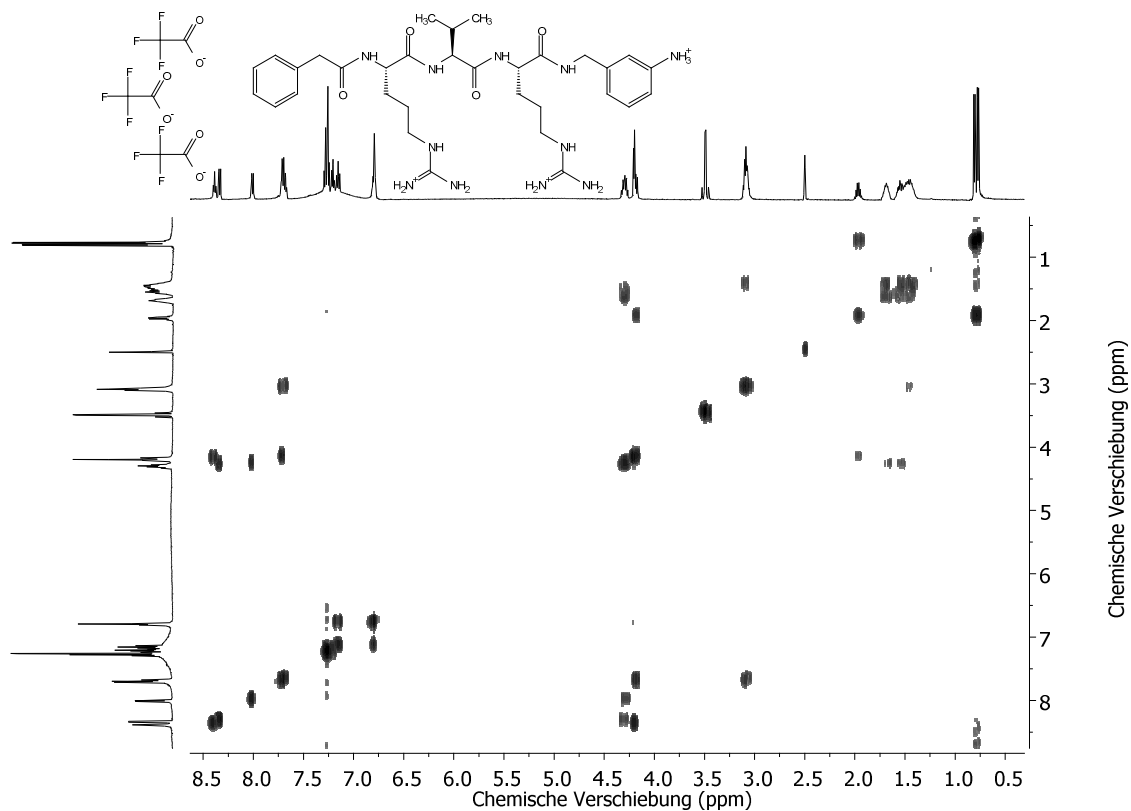


Abbildung 116: H,H-COSY-Spektrum des Inhibitors **59** (400 MHz, DMSO- d_6).

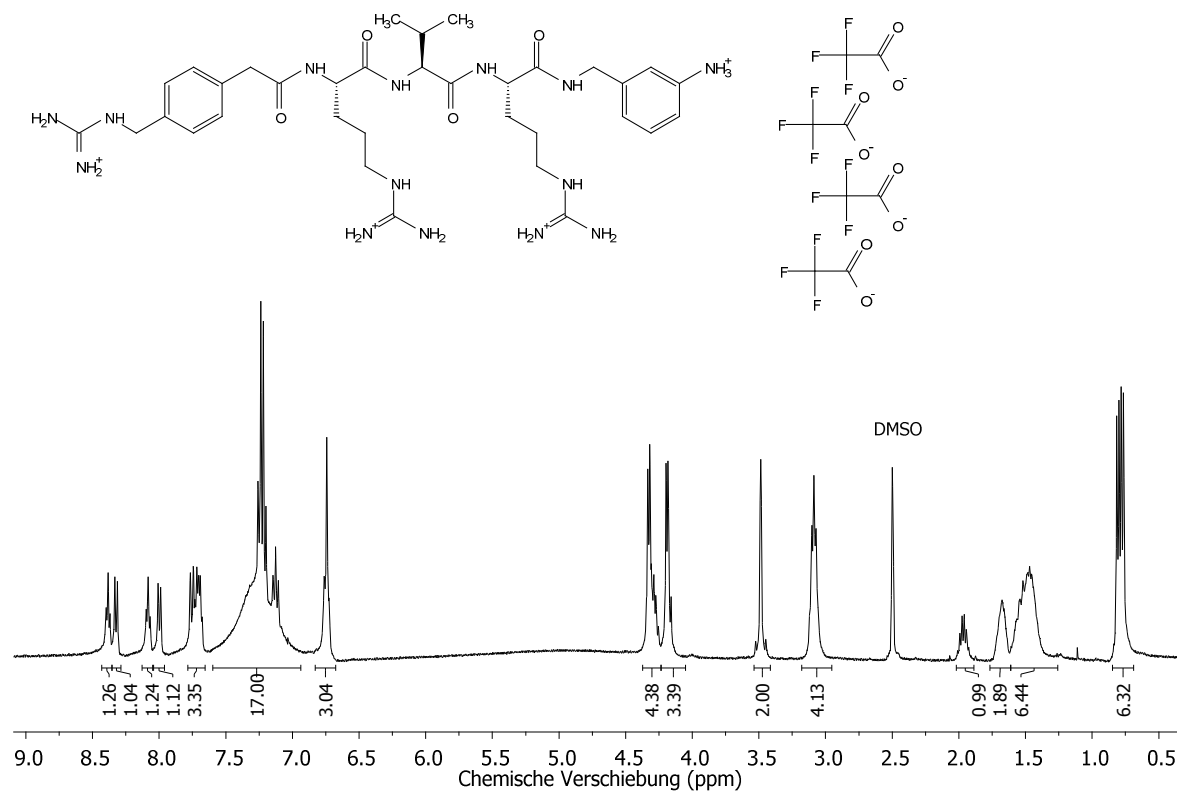


Abbildung 117: ^1H -Spektrum des Inhibitors **67** (500 MHz, DMSO-d_6).

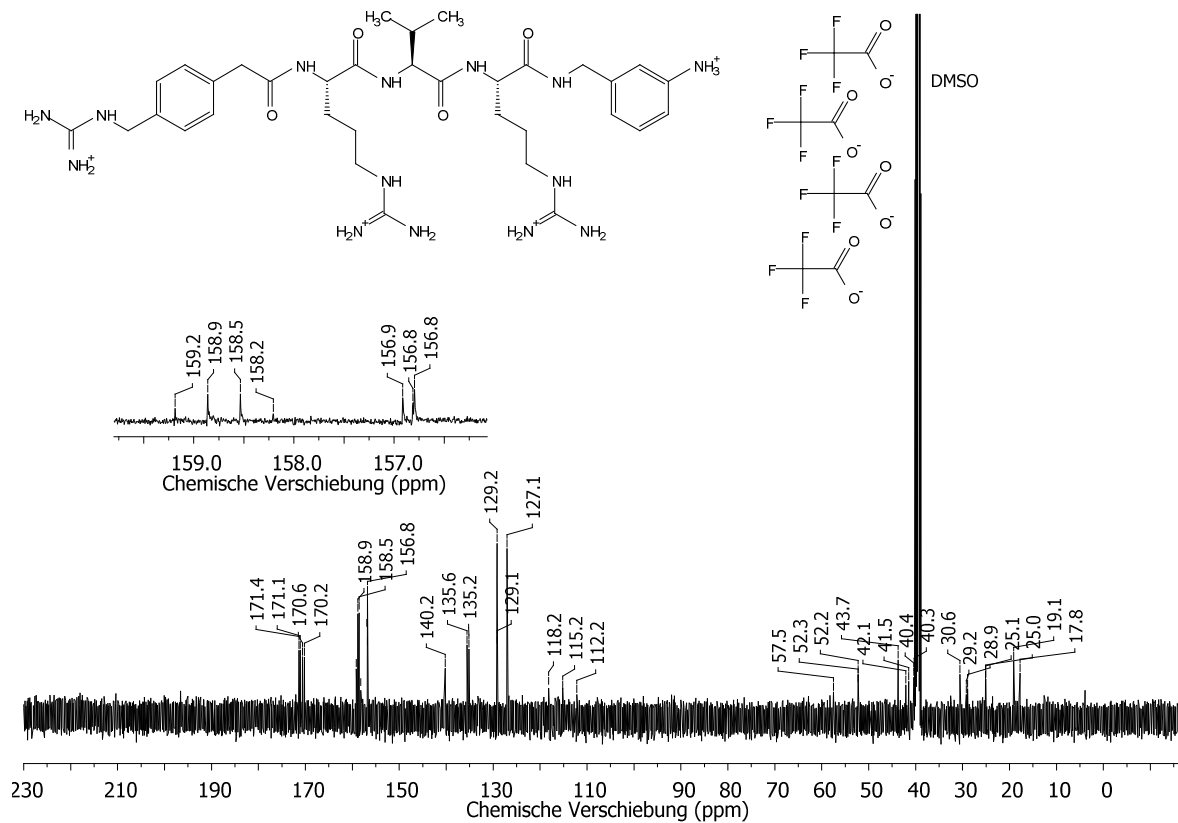


Abbildung 118: ^{13}C -Spektrum des Inhibitors **67** (101 MHz, DMSO-d_6).

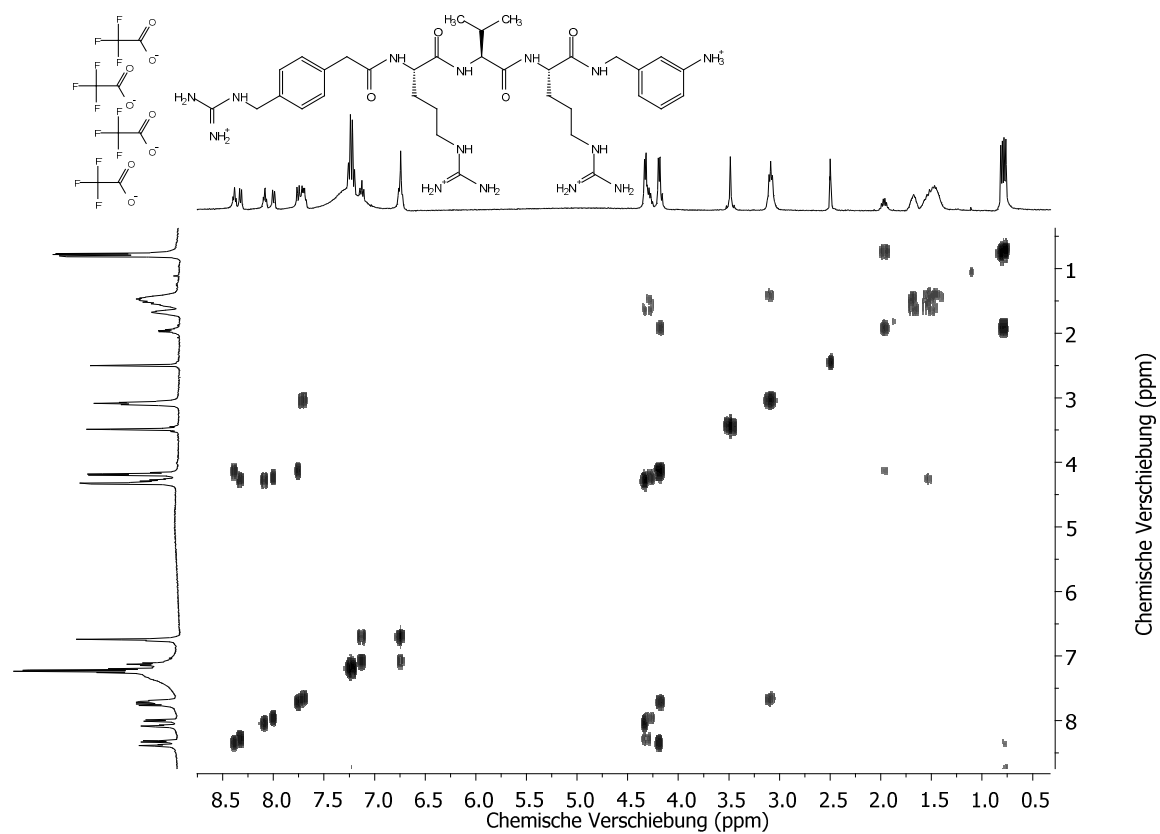


Abbildung 119: H,H-COSY-Spektrum des Inhibitors **67** (400 MHz, DMSO-d₆).

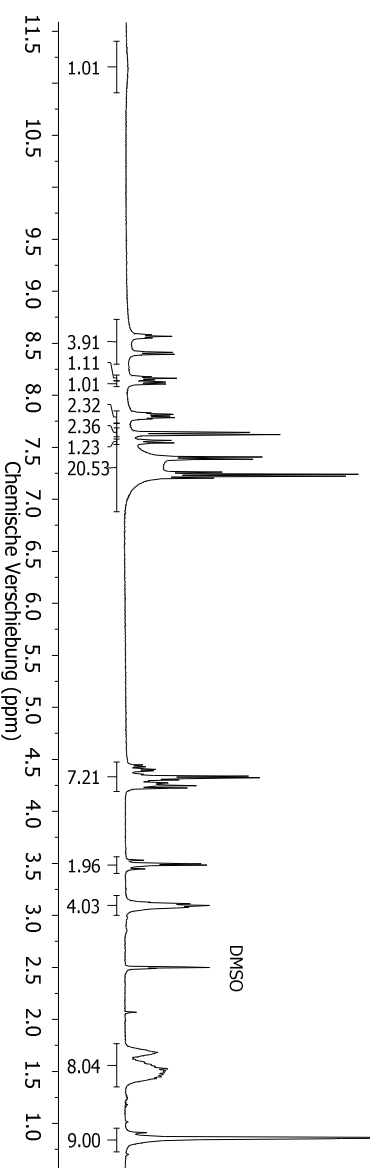
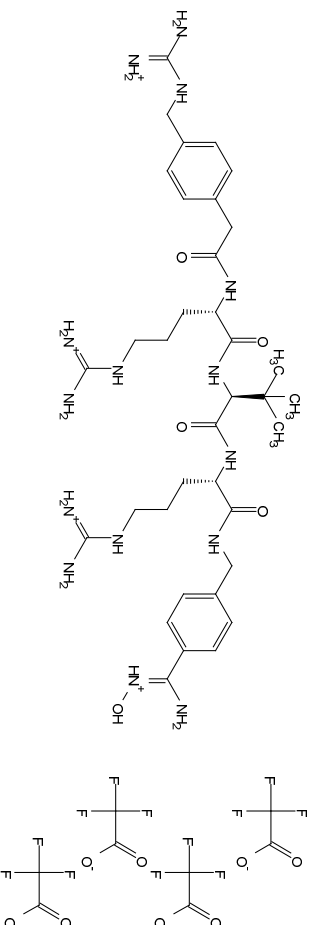


Abbildung 120: ^1H -Spektrum des Inhibitors **73** (400 MHz, DMSO-d_6).

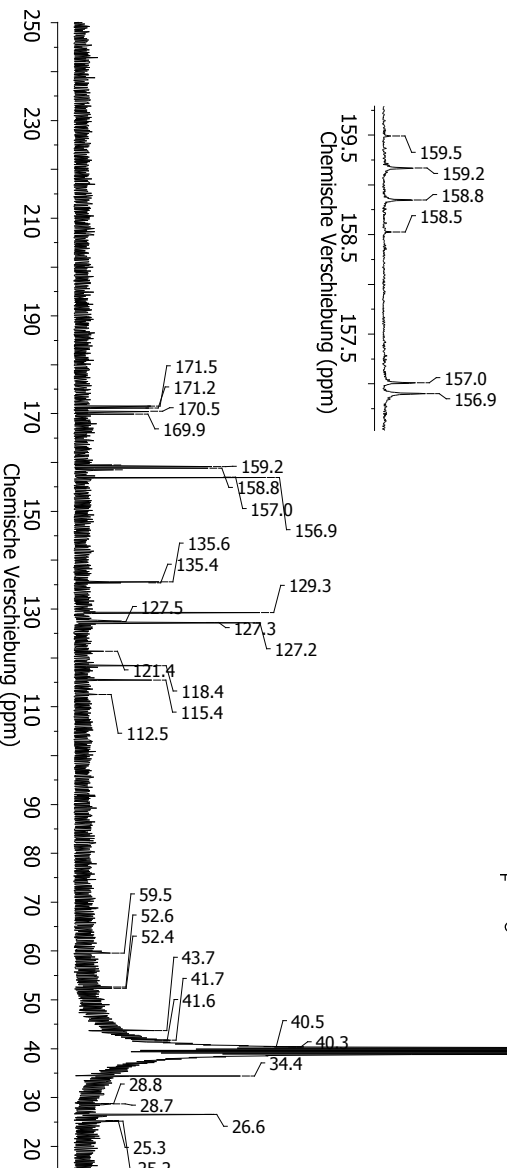
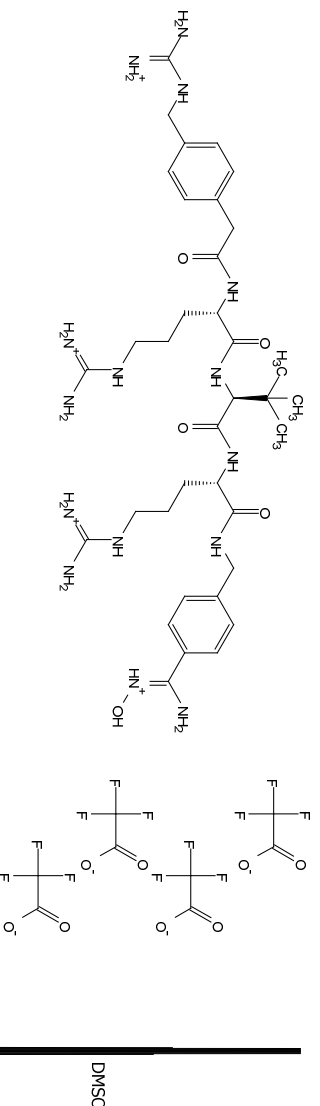


Abbildung 121: ^{13}C -Spektrum des Inhibitors **73** (101 MHz, DMSO-d_6).

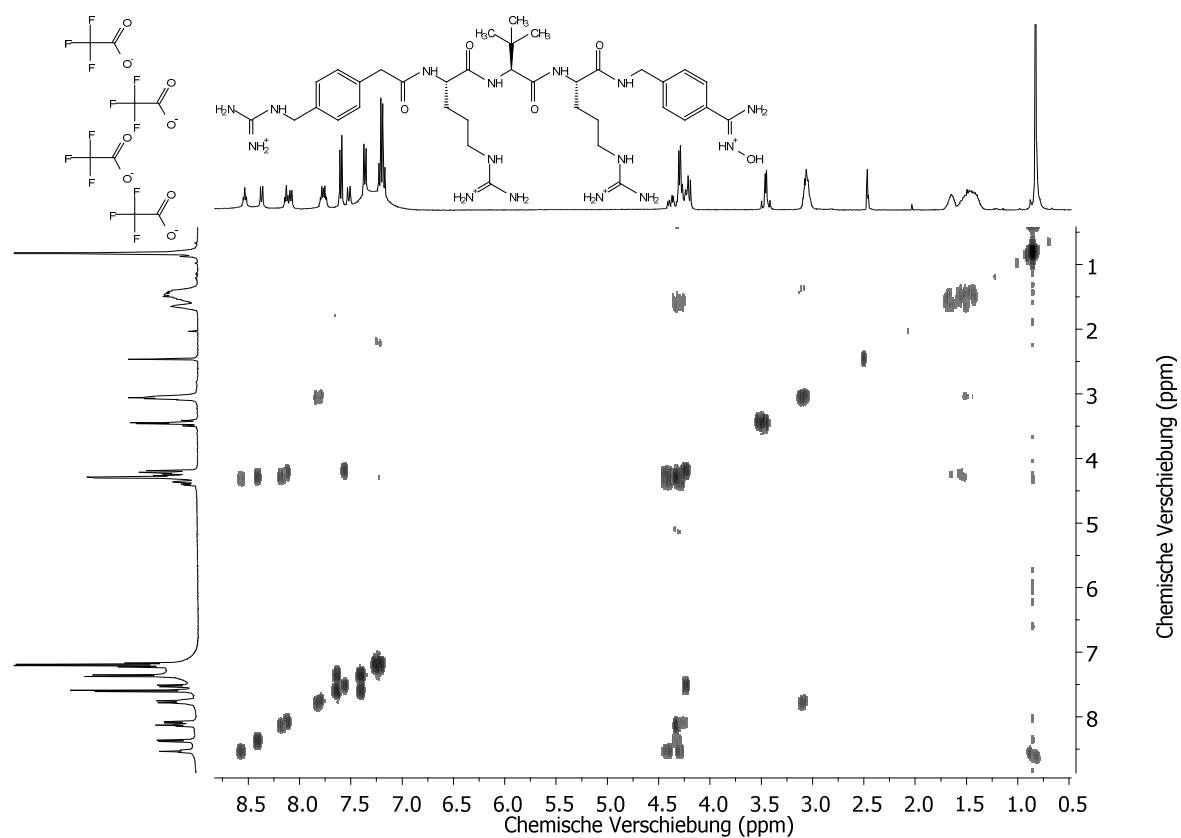
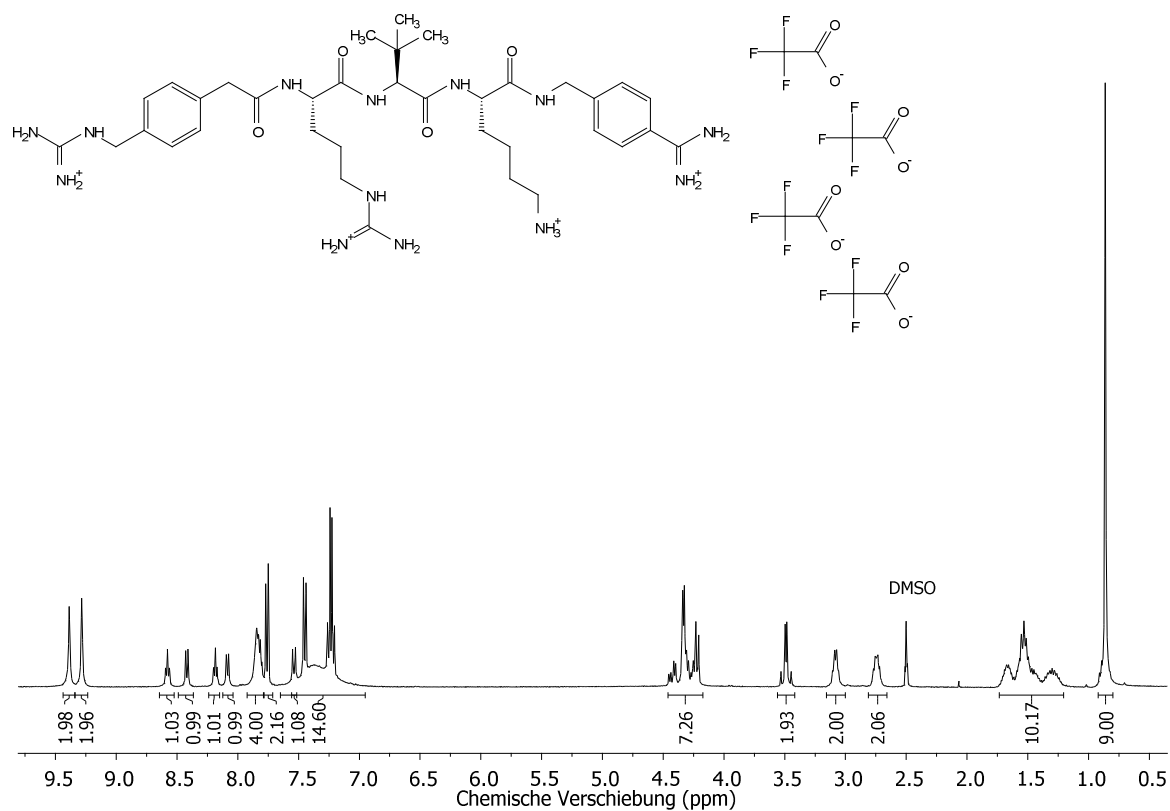
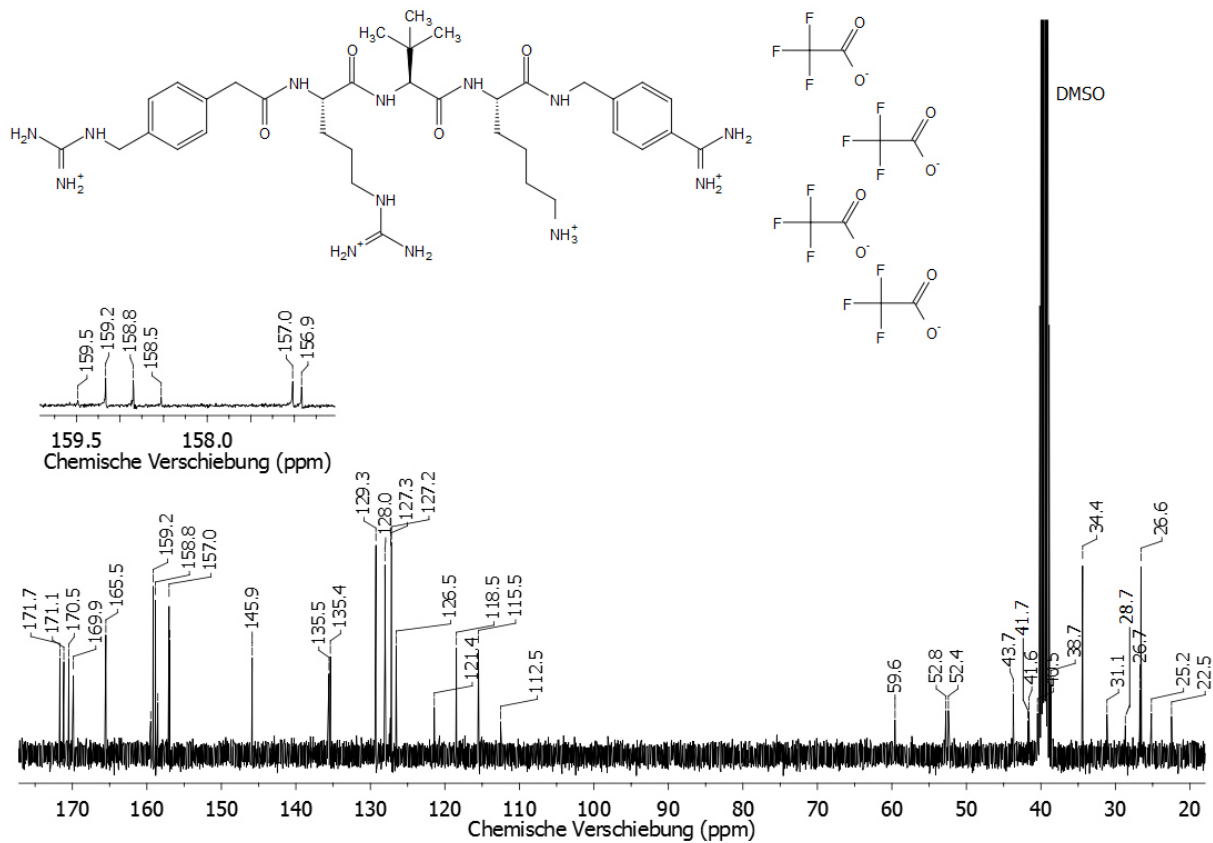


Abbildung 122: H,H-COSY-Spektrum des Inhibitors **73** (400 MHz, DMSO-d₆).

Abbildung 123: ¹H-Spektrum des Inhibitors **106** (400 MHz, DMSO-d₆).Abbildung 124: ¹³C-Spektrum des Inhibitors **106** (101 MHz, DMSO-d₆).

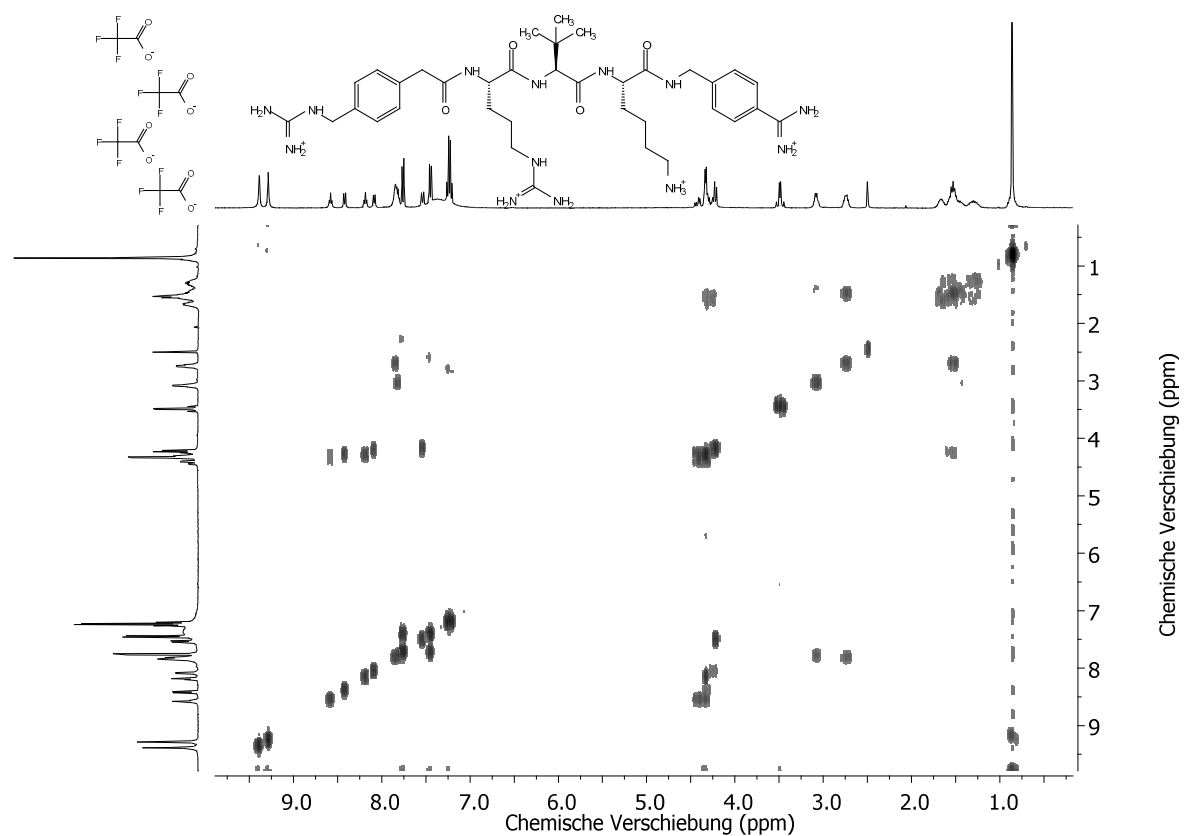


Abbildung 125: H,H-COSY-Spektrum des Inhibitors **106** (400 MHz, DMSO-d₆).

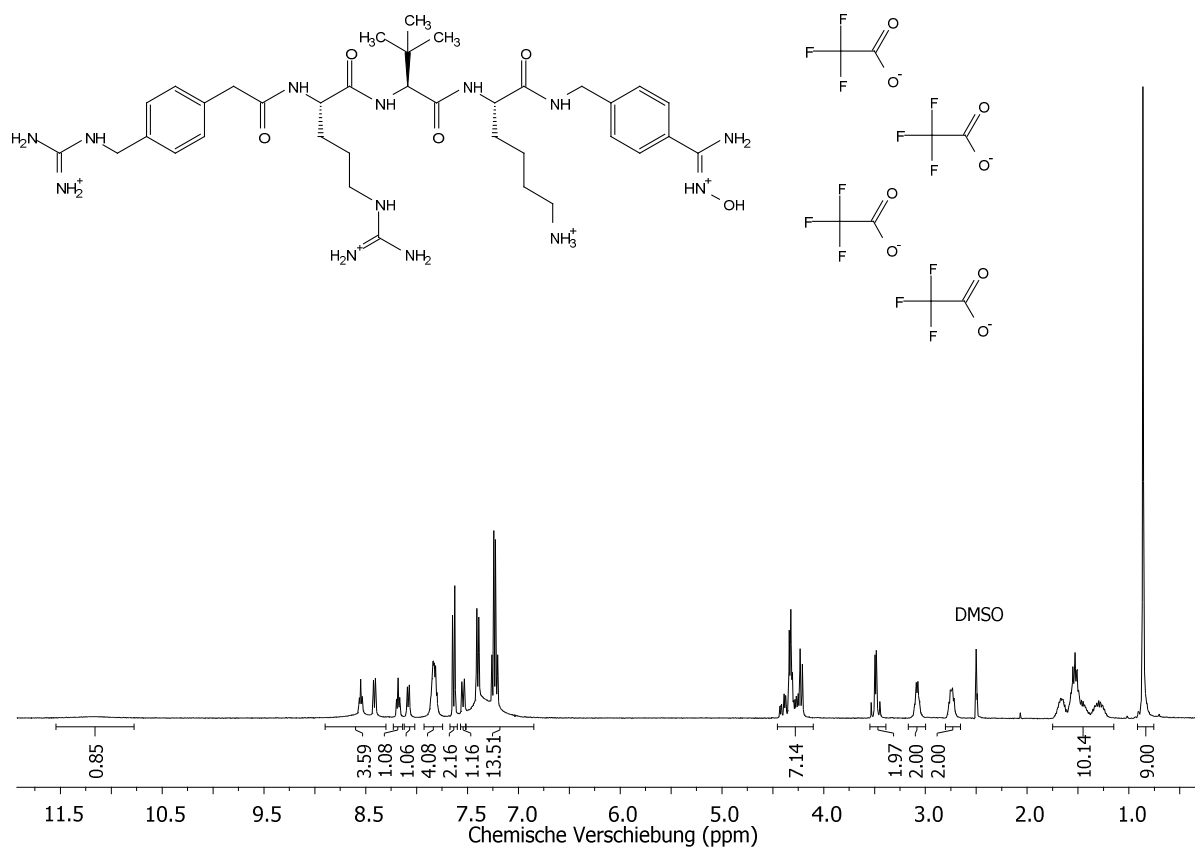


Abbildung 126: ^1H -Spektrum des Inhibitors **108** (400 MHz, DMSO-d_6).

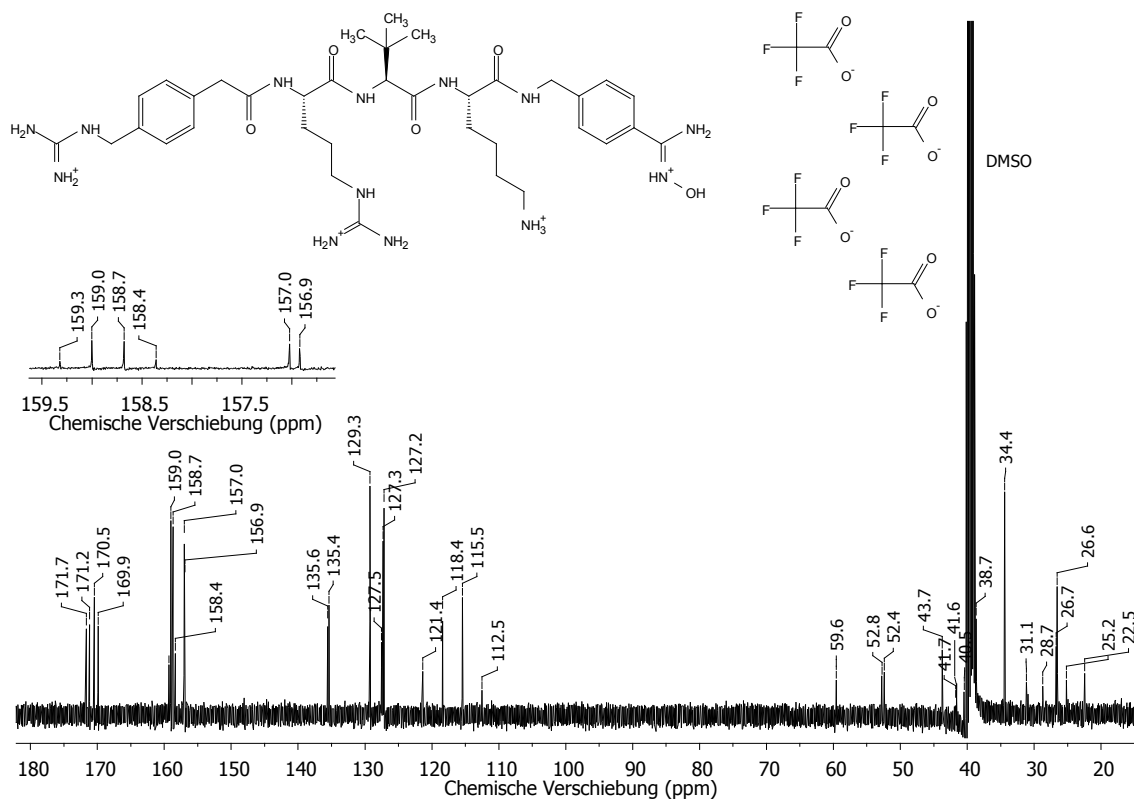


Abbildung 127: ^{13}C -Spektrum des Inhibitors **108** (101 MHz, DMSO-d_6).

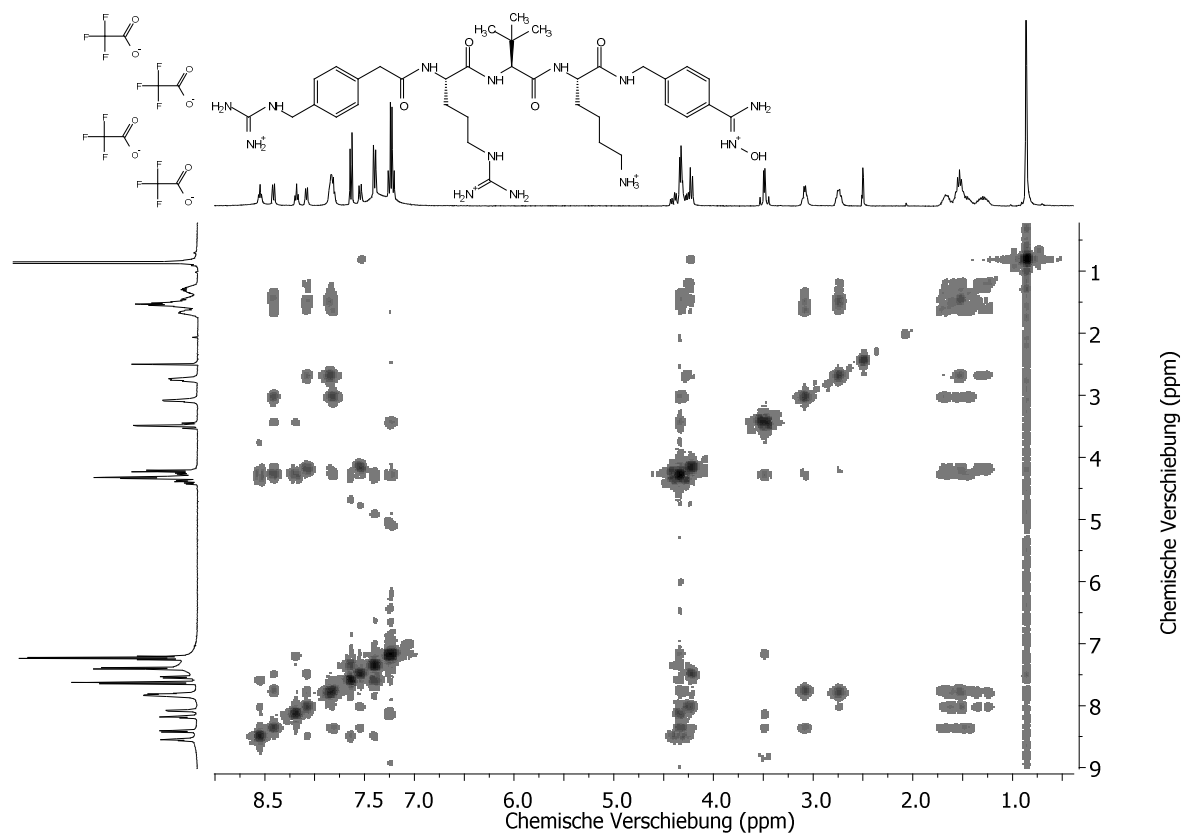


Abbildung 128: H,H-TOCSY-Spektrum des Inhibitors **108** (500 MHz, DMSO-d₆).

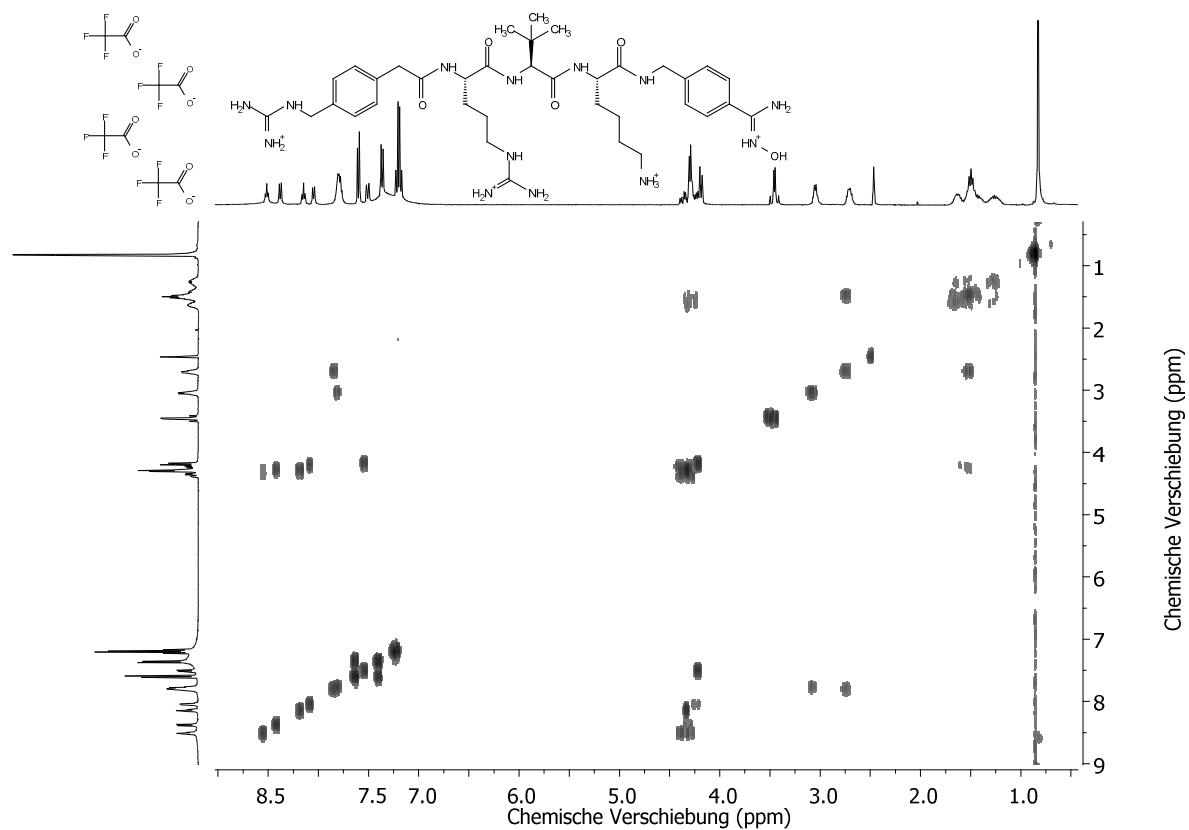


Abbildung 129: H,H-COSY-Spektrum des Inhibitors **108** (400 MHz, DMSO-d₆).

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Beiträge zur Inhibierung der Proproteinkonvertase Furin“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 23.10.2017

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Teodora Petrova Ivanova
Staatsangehörigkeit	Bulgarisch
Geburtsdatum	23.12.1990
Geburtsort	Botevgrad, Bulgarien

Ausbildung

1997 – 2004	Grundschule „Nikola Vaptzarov“, Botevgrad
2004 – 2009	Fremdsprachengymnasium „Aleko Konstantinov“, Pravetz Abschluss: Diplom über Oberschulbildung/Abitur
01.10.2009 – 01.10.2013	Philipps-Universität Marburg Studium der Pharmazie Abschluss: Staatsexamen
19.03.2012 – 06.04.2012	Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Keusgen Wahlpflichtpraktikantin
01.08.2012 – 31.10.2012	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie Philipps-Universität Marburg Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Kockskämper Studentische Hilfskraft
01.11.2013 – 30.04.2014	Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer Pharmaziepraktikantin
01.05.2014 – 31.10.2014	Liebig-Apotheke Klinikstraße 33 35392 Gießen Pharmaziepraktikantin
11.12.2014	Approbation als Apothekerin
ab dem 17.11.2014	Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin

Marburg, den 23.10.2017

Unterschrift:

Danksagung

Den erfolgreichen Abschluss dieser Promotion verdanke ich vielen Menschen. An dieser Stelle möchte ich ihnen allen ausdrücklich sagen, dass ihre große Hilfe nicht unbemerkt geblieben ist.

Bei meinem Betreuer Prof. Torsten Steinmetzer bedanke ich mich dafür, dass ich in seiner Arbeitsgruppe promovieren durfte. Seine Tür war für mich immer offen – ich weiß das sehr zu schätzen und bin mir bewusst, dass das eben nicht selbstverständlich ist. Herzlichen Dank auch für die sorgfältige und hilfreiche Korrektur meiner Dissertation.

Prof. Martin Schlitzer bin ich sehr dankbar dafür, dass er sich bereitwillig als Zweitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Jens Kockskämper danke ich vielmals für seine Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen. Auch für sein Vertrauen und die Möglichkeit, schon während meines Studiums in seinem Arbeitskreis auf einem sehr interessanten Forschungsgebiet zu arbeiten, bedanke ich mich ganz herzlich.

Für seine Teilnahme an der Prüfungskommission richte ich meinen Dank auch an Prof. Carsten Culmsee.

Bei Dr. Bastian Thaa sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Wolfgang Garten, Prof. Ralf Bartenschlager, Prof. Rolf Hilgenfeld und Prof. Kirsten Sandvig bedanke ich mich für die Durchführung der Zellkulturversuche bzw. einiger enzymkinetischer Messungen, die in der Dissertation beschrieben sind. Mein Dank gilt auch Prof. Iris Lindberg für die Bereitstellung der für diese Arbeit verwendeten Enzyme sowie Prof. Veronika von Messling (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) und Prof. Stephan Becker (Institut für Virologie, Universität Marburg) für die Finanzierung der *in vivo*-Studien.

Ein weiterer Dank geht an Stefan Newel und Dr. Regina Ortmann für die Aufnahme der NMR-Spektren und die Hilfe bei Fragen bezüglich deren Auswertung. Für die Aufnahme der Massenspektren bedanke ich mich bei Nina Zitzer und Dr. Gabriela Laufenberg. Besonders verbunden bin ich Nina für die netten persönlichen Gespräche, die gemütlichen Teestunden und die aufmunternden Worte, die den einen oder anderen Arbeitstag erleichtert haben.

Ein großes Dankeschön an Dr. Stefan Merkl und Dr. Doru Vornicescu, meine Betreuer während meines Wahlpflichtpraktikums in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Keusgen. Danke für die interessanten Themenstellungen, für Euer Vertrauen und für die freie Hand, die Ihr mir im Labor gegeben habt. Ihr habt meine Liebe zur Wissenschaft weiterentwickelt und mich auf dem Weg zur Promotion und auch danach ermutigt.

Meine Kollegen Heike Lang-Henkel, Dr. Kornelia Harges, Dr. Zouhir Hammamy, Dr. Alexander Maiwald, Dr. Wegderes Endreas, Jenny Kouretova, Dominik Felix, Anton Epp, Aline Keils, Stefan Hinkes, Benjamin Wenzel, Dorothee Rogge, Tatjana Wanik, Oliver Pilgram und Dr. Armin Reichenberg haben immer für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt. Jeder von Euch hat auf die eine oder andere Weise – sei es durch fachliche Tipps, praktische Unterstützung oder ein nettes Wort zum richtigen Zeitpunkt – meine Arbeit erleichtert, und das werde ich nie vergessen.

Auch bei allen Assistenten des Erstsemesterpraktikums bedanke ich mich dafür, dass wir zusammen viel Spaß an der Arbeit hatten.

Für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanke ich mich ausdrücklich bei Jenny. Du hast ganz besonders dafür gesorgt, dass ich mich schon von Anfang an als eine von Euch gefühlt habe. Ich danke Dir für die lustige Zeit außerhalb der Universität sowie für Deine aufmunternden Worte in schwierigen Situationen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Kornelia für ihre vielseitige praktische Hilfe, moralische Unterstützung und die wunderschöne Zusammenarbeit. Du hast meine zahlreichen Fragen immer mit Geduld und Kompetenz beantwortet und hast mir so viel beigebracht. Du warst und bleibst mein Vorbild! Selbst in stressigen Situationen hast Du immer Zeit für mich gefunden und mich ermutigt, und für all das bin ich Dir unendlich dankbar!

Weg hat mir geholfen, meine große Liebe zur NMR-Spektroskopie zu entdecken, und das wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Meine Praktikanten Yang Lu, Lukas Imberg, Sausan Kallas, Christine Schlutt, Carolin Lang, Frederik Röhrig, Charlotte Horn und Xander Kessler haben mit großem Fleiß gearbeitet und mir dabei sehr viel geholfen, und dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Bei meinen „Mitbewohnerinnen“ Christine Schlutt und Phuong Pham bedanke ich mich für die wunderschöne Zeit, die wir zusammen hatten. Ihr habt mich nicht nur einmal mit fachlichem Rat und einfühlsamen Aufmunterungen unterstützt und meine Arbeitstage verschönert. Die gemeinsamen Abende werden in meinem Herzen bleiben!

Mein besonderer Dank geht an Armin – für seine enorme und vielseitige Hilfe bei der Arbeit, vor allem aber für seine stete moralische Unterstützung in guten und schlechten Zeiten. Ich danke Dir für die schönen Momente in und außerhalb der Universität, für Deine Freundschaft und Deine Menschlichkeit.

Für das aufmerksame und ausführliche Korrekturlesen meiner Dissertation bedanke ich mich recht herzlich bei Michael und Phuong.

Für ihre Unterstützung bin ich allen meinen Freunden sehr verbunden. Danke, dass Ihr mich versteht und mir verzeiht, dass ich oft so wenig Zeit für Euch hatte...

Frank bin ich ausgesprochen dankbar – nicht nur für seine unersetzliche Hilfe bei allen möglichen Computerangelegenheiten, sondern auch dafür, dass er die Geduld hatte, mir einen für mich neuen, spannenden Blick auf die Computerwelt zu eröffnen. Danke, dass Du mich so akzeptierst, wie ich bin, ohne dass Du mich immer verstehen müsstest. Danke für Deine Himmelsgeduld und Deine Freundschaft.

Unendlich dankbar bin ich Michael für seine stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Danke, dass Du jederzeit für mich da bist und in jeder Situation auf meiner Seite stehst. Danke für Deine kompetente Hilfe bei verschiedensten Fragen bezüglich meiner Arbeit, aber auch dafür, dass ich und nicht meine Dissertation für Dich im Vordergrund stand (der Rote-Bete-Auflauf hat mich nicht nur einmal vor dem Verhungern gerettet). Danke für Dein Verständnis und Deine Geduld. Danke, dass ich Dich – trotz aller Schwierigkeiten – als den besten Freund habe, den man sich jemals wünschen kann!

Mein größter Dank geht an meine Familie – für alle Opfer, die sie für mich bringen, dafür, dass sie Tag und Nacht für mich da sind und dass sie immer an mich glauben. Dafür, dass ich sie habe. Eure unerschöpfliche Liebe ist mein größter Reichtum. Danke, dass Ihr meine Konstanten seid!